

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Fyziologie živočichů



Bc. Lucia Komárková

Role ghrelinu v modulaci neuropatické bolesti

The role of ghrelin in modulation of neuropathic pain

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: doc. MVDr. Šimon Vaculín, Ph.D

Praha, 2016

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 25. 4. 2016

Podpis

Poděkování:

Děkuji svému školiči doc. MVDr. Šimonu Vaculínovi, Ph.D. za cenné rady a pomoc při vypracování této práce. Také bych chtěla poděkovat týmu studentů 3. LF UK podílejících se na provedení experimentů. Dále děkuji své rodině a přátelům za podporu při studiu. Výzkum byl financován z grantů PRVOUK P33 a SGS09/LF/2014.

Lucia Komárková

Abstrakt

Neuropatickou bolest stále nedokážeme efektivně potlačit, proto nadále zůstává závažným problémem. Ghrelin, orexigenní hormon z enteroendokrinních buněk žaludku, by mohl svým antinocicepčním vlivem přispět k jejímu potlačení. Dřívější práce ukázaly, že ghrelin zabrání rozvoji nocicepčních symptomů neuropatické bolesti. Cílem naší práce bylo zjistit, zda chronicky podávaný ghrelin bude mít vliv na již plně rozvinutou neuropatickou bolest a odlišit jeho antinocicepční a analgetický účinek. Použili jsme model chronické konstrikce sedacího nervu. Ukázali jsme, že ghrelin potlačil již rozvinutou tepelnou i mechanickou hyperalgezi, takže nejen zabrání rozvoji, ale také potlačí již rozvinuté nocicepční symptomy. Z testů analgezie ale vyplynulo, že neovlivnil teplotní preferenci, ani nevyvolal preferenci místa. Předpokládáme tedy, že ghrelin nepůsobí analgeticky u neuropatické bolesti a antinocicepční efekt by mohl být způsoben spíše jeho protizánětlivým nebo neuroprotektivním vlivem.

Klíčová slova:

Ghrelin, neuropatická bolest, chronická konstrikce sedacího nervu, preferenční metody

Abstract

We are still unable to effectively suppress neuropathic pain, therefore it remains a serious problem. Ghrelin, the orexigenic hormone released by enteroendocrine stomach cells, could contribute to alleviation of the neuropathic pain by its antinociceptive effect. Previous studies have shown that ghrelin prevents development of nociceptive symptoms of neuropathic pain. The aim of our study was to determine whether chronic administration of ghrelin will affect the already fully developed neuropathic pain and differentiate its antinociceptive and analgesic effect. We used a model of chronic constriction injury of the sciatic nerve. We have proven that ghrelin suppressed the already developed thermal and mechanical hyperalgesia, so ghrelin not only prevents the development, but also suppresses the already developed nociceptive symptoms. However analgesia test showed that ghrelin did not affect the temperature preference, neither did induce the place preference. We suppose that ghrelin does not cause analgesia in neuropathic pain and its antinociceptive effect could be caused by anti-inflammatory or neuroprotective action.

Key words:

Ghrelin, neuropathic pain, chronic constriction injury, preference methods

Obsah

Seznam použitých zkratk.....	6
Úvod.....	8
LITERÁRNÍ PŘEHLED.....	9
• 1 Bolest a základní pojmy	9
○ 1.1 Definice bolesti a nocicepce	9
○ 1.2 Dráhy vedení a inhibice bolesti	11
○ 1.3 Typy bolesti	14
○ 1.4 Dimenze bolesti	15
○ 1.5 Obranný únikový reflex, hyperalgezie a alodynie	16
• 2 Ghrelin.....	17
○ 2.1 Ghrelin a bolest.....	20
• 3 Preferenční metody	22
○ 3.1 Metoda podmíněné preference místa.....	22
○ 3.2 Metoda teplotní preference	24
CÍLE	25
MATERIÁL A METODY	26
VÝSLEDKY	33
• 1 Prahy bolesti.....	33
• 2 Teplotní preference	37
• 3 Podmíněná preference místa	39
DISKUZE.....	41
• 1 Vliv CCI na reflexní odpověď	41
• 2 Vliv CCI na teplotní preferenci	42
• 3 Účinek ghrelinu	43
ZÁVĚR.....	46
LITERATURA.....	47

Seznam použitých zkratk

AgRP - Agouti-related protein
AM - Afektivě-motivační
AMK - Aminokyselina
ANOVA - Analýza rozptylu
ASIC - Acid-sensing ion channel
CCI - Chronic constriction injury
CNS - Centrální nervový systém
CPP - Condition place preference
DAG - Diacylglycerol
GABA - Kyselina γ -aminomáselná
GHSR - Growth hormone secretagogue receptor
HEB - Hematoencefalická bariéra
IASP - International association for the study of pain
IL-1 β - Interleukin 1 β
IL-6 - Interleukin 6
IP₃ - Inositoltrifosfát
KE - Kognitivně-evaluační
LHA - Laterální hypotalamická oblast
NF- κ B - Nuclear factor κ B
NO - Oxid dusnatý
NPY - Neuropeptid Y
NS - Nocicepčně specifický
PAG - Periakveduktální šed'
POMC - Proopiomelanokortin
PVN - Paraventriculární jádro
RVM - Rostrální ventromediální prodloužená mícha
SD - Senzoricko-diskriminační
TNF- α - Tumor necrosis factor α
TPP - Thermal place preference
TRPM - Transient receptor potential - melastatin
TRPV - Transient receptor potential - vanilloid
VPL - Ventrální posterolaterální jádro

VPM - Ventrální posteromediální jádro

WDR - Wide-dynamic range

Úvod

Obézní jedinci trpí častěji chronickou bolestí než jedinci štíhlí. Řada těchto bolestí je vysvětlitelná nadměrnou fyzikální a mechanickou zátěží, diabetickou neuropatií a dalšími faktory. Nicméně k rozvoji chronických bolestí u obézních lidí může přispívat i výrazně snížená hladina ghrelinu. Tento hormon totiž ovlivňuje různé fyziologické procesy – od paměti až právě po bolest. Takže se zvažuje, zda by exogenní či endogenní zvýšení hladiny ghrelinu nemohlo pomoci při chronických bolestech u obézních jedinců.

Nedávno byl u zvířat prokázán antinocicepční vliv ghrelinu na práh bolesti (Wei a spol., 2013). Stejný účinek mělo podávání ghrelinu i u zánětlivé bolesti (Sibilia a spol., 2006) a dokonce i u neuropatické bolesti (Guneli a spol., 2010b). Přesný mechanismus antinocicepčního působení ghrelinu však zůstává dále nejasný.

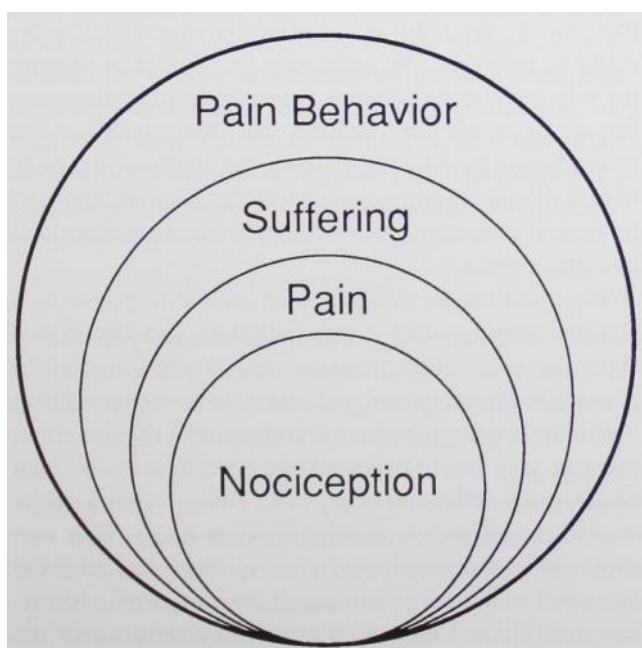
LITERÁRNÍ PŘEHLED

1 Bolest a základní pojmy

1.1 Definice bolesti a nocicepce

Definovat bolest je obtížné. K pocitu bolesti není totiž vůbec nutná fyzická existence těla, protože bolest můžeme vyvolat pouhou stimulací určitých oblastí mozku, což dokládají i fantomové bolesti po amputaci končetiny. Pocit bolesti je tedy jenom určitý časoprostorový vzorec neurální aktivity mozku (pain matrix).

IASP (Mezinárodní asociace pro studium bolesti) bolest definuje jako nepříjemnou emocionální a senzorkou zkušenost, doprovázenou přímým nebo potenciálním poškozením tkáně, nebo popisovanou výrazy takového poškození (IASP, 1979), a tato definice je obecně přijímaná. Podle konceptu bolesti (Obr. 1) rozlišujeme 4 složky bolesti a to 1) nocicepci, jež předchází samotné bolesti a představuje hlavně aktivaci nociceptorů a transmissi signálu, 2) bolest, která znamená percepci nociceptivního stimulu, 3) utrpení, což je negativní odpověď mozku na bolest a podobné stavy, a 4) bolestivé chování, které je pozorovatelné okolím. Všechny komponenty se mohou vyskytovat i samostatně nezávisle na zbylých, např.



nocicepce nemusí nutně vést k bolesti a bolestivé chování se může projevit i bez bolesti.

I přesto, že bolest je nepříjemný smyslový vjem, můžeme na ni v některých případech nahlížet jako na přínosný fyziologický děj, který má funkci obrannou. Díky ní můžeme včas předejít poškození tkáně. Problém nastane, pokud bolest svoji informativní složku ztratí a stane se z ní patologický stav bez jakéhokoliv užítu pro pacienta.

Obr. 1: Koncept bolesti (LOESER, John D. Pain and suffering. The Clinical journal of pain, 2000, 16.2: S2-S6).

Nocicepce a nociceptory

Jde o periferní a centrální nervový proces, jehož výsledkem může být pocit bolesti. Nocicepce zahrnuje aktivaci nociceptorů, transmissi signálu nervovými vlákny do dorzálních rohů míšních a přenos informace do vyšších mozkových center. Nocicepce tedy není synonymem bolesti, představuje jen proces zaznamenání a vedení potenciálně škodlivého podnětu.

Nociceptory představují velmi heterogenní skupinu specializovaných volných nervových zakončení, která jsou umístěna téměř ve všech tkáních těla. Aktivující se stimulem, který může potenciálně poškodit tkáň. Jde o primární senzory a můžeme je rozdělit podle stimulu, na který reagují, na nociceptory vnímající teplotní, mechanické a chemické podněty (Julius a Basbaum, 2001).

Teplotní nociceptory rozlišujeme na tepelné a chladové podle teplotního rozmezí, ve kterém se aktivují. Pro tepelné nociceptory je toto rozmezí mezi 35 a 45 °C a dochází u nich k expresi iontových kanálů rodiny TRPV (transient receptor potential - vanilloid) (Leffler a spol., 2006). Chladové nociceptory se aktivují mezi 8 a 10 °C (Cain a spol., 2001) a nalézáme u nich iontové kanály převážně z rodiny TRPM (transient receptor potential - melastatin) (McKemy a spol., 2002). Tato teplotní rozmezí odpovídají hodnotám, při nichž může dojít k poškození tkání.

Mechanické nociceptory reagují na mechanické a tlakové podněty (tah, tlak, říznutí). Jejich aktivace probíhá většinou přímo pomocí mechanosenzitivních iontových kanálů. Chemické nociceptory zaznamenávají přítomnost některých látek (např. H^+ , histamin, adenosintrifosfát, bradykinin, serotonin, substance P atd.) (Julius a Basbaum, 2001) pomocí receptorů a iontových kanálů jako jsou například ASIC (acid-sensing ion channel), které reagují na přítomnost H^+ (Leffler a spol., 2006), receptory P2X zaznamenávající molekuly adenosintrifosfátu, B2 kanály odpovídající na molekuly bradykininu a H1 kanály, které registrují výskyt histaminu. Některé stimuly poškozující tkáň ovšem nociceptory zaznamenat nedokážou. Týká se to například ultrafialového záření nebo rentgenových paprsků (Loeser a Treede, 2008) a bolest neucítíme ani po poškození jaterního, ledvinného nebo plicního parenchymu, které neobsahují volná nervová zakončení s nociceptory.

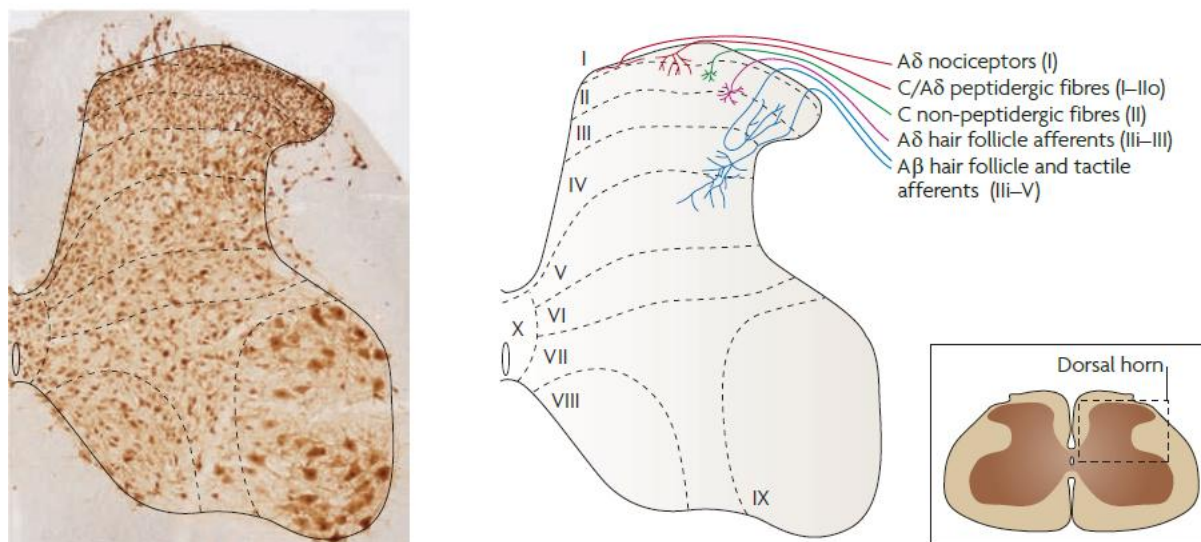
Dále můžeme nociceptory členit podle velikosti a myelinizace aferentního axonu. Nociceptory A δ mají vlákna středně silná, myelinizovaná a vedou vzruchy střední rychlostí, tedy přibližně 5-15 m·s⁻¹ (Rossi a spol., 2000). Jejich význam je především ve zprostředkování první fáze bolesti, která je popisována jako ostrá, dobře lokalizovatelná bolest. Typ C patří k vláknům tenkým a nemyelinizovaným, proto vedou vzruchy pomalu, cca

0,5-3 $\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ (Qiu a spol., 2001). Zajišťují vedení druhé vlny bolesti, tupé a špatně lokalizovatelné, zánětlivé bolesti. Vlákná $\text{A}\beta$ vedou za normálních okolností nebolestivé informace z mechanoreceptorů, ale po senzitivaci se účastní i vedení bolesti. Typ $\text{A}\beta$ se řadí mezi silná myelinizovaná vlákna, takže mohou obstarávat jak rychlé vedení bolesti ($30\text{--}100 \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$), nebolestivého dotyku a vibrací, tak propriocepci (Simone a Kajander, 1997).

1.2 Dráhy vedení a inhibice bolesti

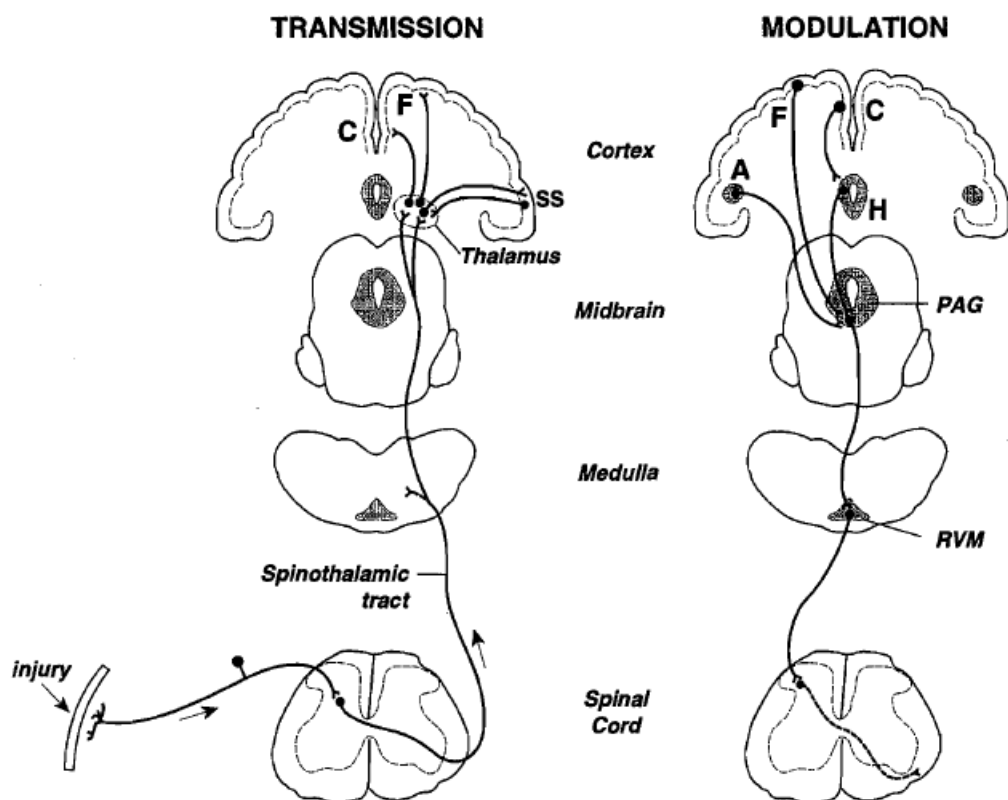
Všechna výše popsaná nocicepční vlákna jsou tvořena pseudounipolárními buňkami, jejichž těla leží ve spinálním gangliu. Tyto primární neurony končí v zadních rožích míšních, přesněji v Rexedových laminách I až V. $\text{A}\delta$ a C vlákna končí zejména v laminách I a II, typ $\text{A}\beta$ ve vrstvách II až V (Obr. 2) (Seal a spol., 2009; Dhaka a spol., 2008). V těchto laminách se nachází i značný počet interneuronů, které mohou ovlivnit nocicepční transmisi. Tyto interneurony mohou být jak inhibiční, tak excitační (Yasaka a spol., 2010).

Soubor vzestupných drah v míše zaznamenávajících percepci bolesti a teploty se označuje jako anterolaterální systém. Primární nocicepční neurony se v laminách přepojují na sekundární neurony, které přecházejí na kontralaterální stranu míchy do bílé hmoty a pokračují rostrálně do mozkového kmene a thalamických jader, kde se dostávají do kontaktu s terciálním neuronem (Spike a spol., 2003).



Obr. 2: Laminární organizace dorzálních rohů míšních a aferentních vstupů (TODD, Andrew J. Neuronal circuitry for pain processing in the dorsal horn. *Nature Reviews Neuroscience*, 2010, 11.12: 823-836).

Hlavní dráhou pro vedení nocicepční informace je spinothalamický trakt, což je vzestupná dráha projikující do jader thalamu, z nich pak do primární a následně i do sekundární somatosenzorické kůry (Obr. 3). V této dráze hrají úlohu dva typy neuronů – WDR (wide-dynamic range) a NS (nocicepčně specifické) neurony. Oba typy neuronů získávají vstupní informace z primárních nocicepčních neuronů, začínají v dorzálních rožích míchy nebo prodloužené míchy (v případě n. trigeminu) a projikují do ventrálního posterolaterálního jádra (VPL) nebo ventrálního posteromediálního jádra (VPM, v případě n. trigeminu) thalamu. Liší se od sebe tím, že WDR neurony početně převládají a odpovídají na širokou škálu intenzity stimulu, naopak NS neurony reagují pouze na nocicepční stimuly.



Obr. 3: Náčrtek přenosu bolestivého vjemu spinothalamickým traktem (vlevo) a sestupné modulace bolesti (vpravo) (FIELDS, H. L. Pain modulation: expectation, opioid analgesia and virtual pain. *Progress in brain research*, 2000, 122: 245).

Kromě spinothalamické existuje i řada dalších drah, které končí v různých oblastech mozku. Spinoretikulární dráha vede do retikulární formace v mozkovém kmeni a přispívá k neurovegetativní odpovědi na bolest a afektivně-motivační dimenzi bolesti (viz níže).

Spinomesencefalický trakt zahrnující periaqueductální šed' (PAG) a colliculus superior ve středním mozku (Yeziarski a Broton, 1991) zodpovídá za endogenní inhibici bolesti. Spinoparabrachiální dráha zapojuje parabrachiální jádro v mozkovém kmeni a získává vstupy

i ze spinomesencefalického a spinoretikulárního traktu. Spinoparabrachiální dráha dává vznik dvěma dalším traktům, a to spinoparabrachio-amygdalárnímu a spinoparabrachio-hypotalamickému, které zajišťují zpracování afektivně-motivační složky bolesti a řídí také neuroendokrinní reakce na bolest (Richard a spol., 2005).

Modulační systémy bolesti

Normální stav organismu, tj. bez bolesti, je výsledkem rovnováhy mezi nocicepčním a antinocicepčním systémem. Mimo to je vhodné v některých situacích (ohrožení života, porod) bolest tlumit. Proto mimo nocicepčních mechanismů existují i systémy antinocicepční, které dokážou bolest zmírnit. Oba systémy mezi sebou spolupracují a tvoří tak propojený celek. Jako základní centrum inhibičního systému se označuje periakveduktální šed' (PAG), která se nachází ve středním mozku a při elektrické stimulaci vytváří analgezii bez dalších senzorických nebo motorických efektů. PAG řídí neurony v dorzálních rožích míšních a získává vstupní informace z prefrontálního kortexu, hypotalamu, amygdaly a z míchy (viz výše). PAG projikuje do rostrální ventromediální prodloužené míchy (RVM), která vysílá axony selektivně k nocicepčním neuronům v dorzálních rožích míšních (Obr. 3) a ke spinálnímu trigeminálnímu jádru. PAG je s RVM spojena serotonergními a noradrenergními synapsemi, stejně jako RVM s nocicepčními neurony (Roychowdhury a Fields, 1996).

Tento okruh spojení PAG-RVM může bolest nejenom potlačovat, ale i podporovat. V RVM se nacházejí elektrofyzilogicky odlišné skupiny neuronů, a to On a Off buňky (Fields a spol., 1983). Obě dvě skupiny neuronů projikují do dorzálních rohů míšních. On buňky jsou aktivní při nociceptivním stimulu, zatímco Off skupina buněk je při tom neaktivní. A naopak Off buňky se aktivují, až když jsou On buňky inhibovány pomocí opioidů. Takže se dá říct, že On buňky facilitují transmissi bolesti a Off ji potlačují (Fields a spol., 1995). Bylo zjištěno, že RVM obsahuje ještě jeden typ buněk, a to neutrální buňky. Tyto buňky nemění svoji aktivitu při nocicepci, ani při podání opioidů (Xu a spol., 2007). Přestože většina těchto buněk je serotonergních (Winkler a spol., 2006) a serotonin se účastní modulace bolesti, zůstává jejich funkce nadále nevysvětlena.

Existuje ovšem ještě jeden systém modulace, kdy bolest může být zeslabena simultánním nenocicepčním somatosenzorickým vstupem. Jedná se o teorii vrátkování poprvé popsanou Melzackem a Wallem v roce 1965 (Melzack, 1996). Má se za to, že v dorzálních míšních rožích existují WDR interneurony, které komunikují se senzorickými aferentními vlákny pro bolest a pro hmat. Za normálního stavu vede transmisní buňka informaci o dotyku. Pokud jsou drážděny nociceptory a aktivuje se nocicepční aferentace, transmisní buňka se přepne do

bolestivého módu a vede bolest. Pokud však následně dojde k nadměrnému dráždění dotykových receptorů, přepne se transmisní buňka opět do módu nebolestivého – dotykového, takže místo bolesti vede jen dotyk. Teorii vrátkování se vysvětlují některé běžně pozorované jevy, např. když si zvíře olizuje poraněnou končetinu apod.

1.3 Typy bolesti

Bolest můžeme rozdělit dle určitých kritérií, přičemž se některé vymezené typy mohou navzájem překrývat. Podle kritéria času rozlišujeme bolest akutní a chronickou. Akutní bolest většinou vzniká úrazem, chorobou nebo jako následek operace. Je časově vymezená a zmizí s odstraněním patologického procesu. Doprovází ji některé vegetativní příznaky, jako jsou zrychlený tep, zvýšená dechová frekvence, vazokonstrikce atd. Chronickou bolestí označujeme bolest přetrvávající 3 měsíce nebo bolest trvající déle než je obvyklá doba pro dané onemocnění (Merskey a Bogduk, 1994). Rizikové faktory pro vznik chronické bolesti zahrnují věk, pohlaví, genetické predispozice, špatný fyzický i psychický stav (van Hecke a spol., 2013). Chronickou bolest často doplňují poruchy spánku, zhoršená kvalita života (Palermo a Kiska, 2005), obezita (Hoftun a spol., 2012) a deprese (Barthas a spol., 2015).

Podle místa lokalizace odlišujeme bolest viscerální, somatickou a hlubokou somatickou. Viscerální bolest vedou vlákna z útrobních orgánů, vnímáme ji jako tupou a obtížně lokalizovatelnou bolest. Viscerální bolest nemusí být nutně spojena s poraněním tkáně, vyvolávají ji většinou chemické podněty nebo distenze, naopak teplotní nebo mechanické poškození většinou nezaznamenáme, protože orgány neobsahují nociceptory pro tyto podněty. Somatická bolest, někdy označovaná jako povrchová, vzniká drážděním kožních nociceptorů. Je na rozdíl od viscerální bolesti dobře lokalizovatelná, ostrá a trvá krátce. Hluboká somatická bolest vychází z dráždění nociceptorů ve svalech, kloubech a periostu. Je palčivá, difúznější a také trvá déle než bolest somatická (Sikandar a spol., 2016).

Podle mechanismu vzniku rozeznáváme bolest nocicepční, neuropatickou a psychogenní. Nocicepční bolest vzniká podrážděním nociceptorů stimuly, které mohou poškodit tkáň. Neuropatická bolest se vyvíjí jako následek periferního nebo centrálního nervového poškození a často se řadí kvůli svému dlouhému trvání mezi bolesti chronické. Toto poškození může být mechanické, toxické, ischemické, infekční, metabolické atp. Má se za to, že neuropatická bolest vzniká dlouhodobými změnami nocicepčních drah. Tyto změny se týkají periferních nociceptorů, synapsí zadních rohů míšních, podkorových jader a jader kortikálních a vedou ve výsledku k senzitivizaci neuronů (Lai a spol., 2002; Alessandri-Haber a

spol., 2004). Změny v kortikální aktivitě při neuropatické bolesti se dají účinně potlačit inhibicí Ca^{2+} kanálů (Le Blanc a spol., 2016). Neuropatická bolest se projevuje dvěma symptomy. Prvním z nich je na podnětu nezávislá bolest, někdy označovaná jako spontánní bolest, která přichází bez zjevné příčiny. Druhým symptomem je bolest evokovaná, která přichází po určitém senzoryckém vstupu, nejčastěji po teplotní stimulaci.

Zvláštním typem jsou bolesti psychogenní nebo somatomorfí, které nevznikají na nociceptorech, ale zřejmě v limbickém systému a mozkové kůře (Stoeter a spol., 2007). Vyvolávají je určité psychologické faktory nebo psychiatrická onemocnění.

1.4 Dimenze bolesti

Je zajímavé, že ani po přerušení spinothalamické dráhy, ani po provedení lézí thalamu nebo somatosenzorické kůry, nedojde k analgezi (Lahuerta a spol., 1994). To naznačuje, že bolest má senzorycko-diskriminační (SD) komponentu i silnou emoční/afektivně-motivační (AM) složku. Obě dimenze jsou vedeny paralelními drahami. Někdy se přidává ještě kognitivně-evaluační (KE) dimenze, která slouží k hodnocení, zda je bolest prospěšná nebo není.

Nejvíce prozkoumanou je SD složka, která zpracovává informaci o lokalizaci stimulu a jeho intenzitě a kvalitě. Tyto informace jsou vedeny převážně spinothalamickou drahou a zpracovány jsou primární somatosenzorickou kůrou post-centrálního gyru, kde se nacházejí neurony s velkým recepčním polem a se somatotopickým uspořádáním (Kenshalo a spol., 2000).

AM dimenze představuje emoční prožitek bolesti a udává, jak moc je nám bolest nepříjemná. Zabezpečuje také aktivaci pozornosti a iniciuje snahu ukončit nociceptivní stimul. Anatomicky AM složku zajišťuje limbický systém, respektive přední cingulární kůra, insula a amygdala (Qu a spol., 2011). Zmírnění hodnocení averzivnosti bolesti můžeme dosáhnout pomocí ovlivnění funkce přední cingulární kůry například hypnózou (Rainville a spol., 2002), odoranty (Villemure a spol., 2012) nebo pozitivním emočním stavem (Villemure a Bushnell, 2009).

Nejméně známá KE složka vzniká nejspíše projekcí z přední cingulární kůry do prefrontálního kortexu a nespecifických asociačních oblastí. Funguje především při učení a zhodnocení bolesti. Svoji roli hrají AM a KE dimenze i při modulaci bolesti, kterou můžou zesílit nebo zeslabit, např. pomocí indukce opioidů (Sprenger a spol., 2006).

1.5 Obranný únikový reflex, hyperalgezie a alodynie

Bolest je doprovázena obranným reflexem. Míšní obranný reflex má za úkol vzdálit tělo nebo jeho část od potenciálně škodlivého podnětu a hraje tak významnou roli ve studiu bolesti při použití zvířecích modelů.

Reflex funguje prostřednictvím reflexního oblouku složeného z pěti základních složek: nociceptor, aferentní dráha, centrum, eferentní dráha a výkonný orgán. Iniciace únikového reflexu je zahájena na nociceptoru, signál se šíří senzitivními aferentními dráhami do míchy, kde je přiváděn k motorickým neuronům ve ventrálních kořenech míšních. Pomocí reflexu jsou aktivovány nebo inhibovány ipsi a kontralaterální motoneurony několika míšních segmentů. Jde tedy o reflex polysynaptický a polysegmentální. Eferentní dráhy tvoří axony motoneuronů, které vedou stimul až ke svalům, kde vykonávají většinou flexi ipsilaterální a extenzi kontralaterální končetiny, tím pádem vyvolají odtahnutí od bolestivého podnětu a přenesení váhy těla. Pro obranný reflex je tedy důležitá intaktnost periferních nervů a míšních segmentů. Reflex proběhne i u spinalizovaného zvířete (Schouenborg a Kalliomäki, 1990).

Reflexní únikovou odpověď můžeme využít jako nepřímý ukazatel toho, kdy je podnět bolestivý a kdy ještě není, tzn. prahu bolesti. Práh bolesti je určen jako minimální intenzita stimulace k vyvolání bolestivého vjemu, tedy i obranného reflexu. Jinými slovy jde o rozhraní, které odděluje podnět nebolestivý od podnětu působícího bolest. Pokud se práh bolesti výrazně sníží (např. při zánětu), hovoříme o **alodynii**, čili stavu, kdy nebolestivý/nenocicepční stimul vyvolá bolestivou odpověď. Dalším abnormálním stavem týkající se změněné citlivosti na bolest je **hyperalgezie**, což označuje zvýšenou citlivost k bolestivým podnětům, při které bolestivý podnět vyvolá bolest vyšší intenzity, než je obvyklé. Hyperalgezie a alodynie se běžně vyskytují při bolestivých stavech, jako je výše zmíněný zánět, poranění nebo neuropatická bolest. Mechanismus jejich vzniku není dosud zcela objasněn, předpokládá se, že se podílí všechny úrovně nocicepční dráhy: poruchy inhibiční transmise (Torsney a Macdermott, 2006), změny vnitřní i synaptické plasticity neuronů v dorzálních rožích míšních (Hu a spol., 2006; Gruber-Schoffnegger a spol., 2013) a abnormální změny fungování A β vláken.

2 Ghrelin

Ghrelin je peptid složený z 28 AMK, který produkují především entero-endokrinní buňky žaludečního fundu. Poprvé ho popsal Kojima a spol. v roce 1999 (Kojima a spol., 1999) jako ligand receptoru pro sekreci růstového hormonu (GHSR). Mezi hlavní funkce ghrelinu patří právě sekrece růstového hormonu, dále řízení příjmu potravy, udržování tělesné hmotnosti a energetické bilance organismu. Ghrelin je uvolňován z periferie i z CNS. V periférii ho sekretují orgány gastrointestinálního traktu (žaludek, střevo), ledviny, plíce, placenta, vaječníky, varlata i imunitní buňky. Pak je pasivně přenášen přes hematoencefalickou bariéru (Banks a spol., 2002). Centrálně je ghrelin produkován neurony hypotalamu, mozkové kůry, středního mozku a míchy (Hou a spol., 2006; Vergnano a spol., 2008).

Účinky ghrelinu jsou jak parakrinní, tak endokrinní. Parakrinně funguje ghrelin sekretovaný centrálně na neurony hypotalamu nebo periferní ghrelin ze žaludku parakrinně ovlivňuje žaludeční buňky i neurony a gliové buňky n. vagu (Avau a spol., 2013). Při endokrinním účinku je ghrelin vyplavovaný do krve a oběhovým systémem se dostává k cílovým tkáním, např. ghrelin ze žaludku působí na tukovou tkáň, slinivku a další. Ghrelin zprostředkovává orexigenní signál z periferie a hraje tak důležitou roli v příjmu potravy, ale ovlivňuje i výdej energie, buněčnou proliferaci, funkce gastrointestinální, pankreatické, kardiovaskulární, dýchací i imunitní (Leite-Moreira a Soares, 2007).

Ghrelin je exprimován nejprve jako pre-prohormon ze 117 AMK, který je dále hydrolyzován na proghrelin, peptid tvořený 94 AMK (Kojima a Kangawa, 2005). Při dalším štěpení vznikne výsledný 28AMK ghrelin, který může být acylovaný na pozici serinu-3. Rozlišujeme tak formu acylovanou a neacylovanou. Acylovaná forma, v literatuře většinou označovaná jako ghrelin, vzniká působením enzymu ghrelin-O-acyltransferázy (Gutierrez a spol., 2008). Neacylovaný ghrelin vykazuje menší biologickou aktivitu než acylovaná forma, ale cirkuluje v krvi v desetinásobném množství (Holmes a spol., 2009). Sekvence AMK savčího ghrelinu je vysoce konzervovaná, například lidský a potkaní ghrelin se liší jen ve dvou AMK (Kojima a spol., 2007).

Ghrelinový receptor GHSR se vyskytuje ve dvou variantách. Plně funkční je typ 1a a jeho zkrácená sestříhová varianta 1b (Muccioli a spol., 2001) plní zatím nejasné fyziologické funkce, ale odhaduje se, že negativně reguluje GHSR-1a a zabraňuje tím jeho konstitutivní aktivaci (Leung a spol., 2007). Receptory ghrelinu se nacházejí centrálně hlavně v hypotalamu, středním mozku, Varolově mostu, prodloužené míše a míše, méně pak v hippokampu a mozkové kůře (Zigman a spol., 2006). Periferně se GHSR vyskytuje ve

slinivce břišní, tukové tkáni, štítné žláze a v reprodukčních orgánech (Ueberberg a spol., 2009).

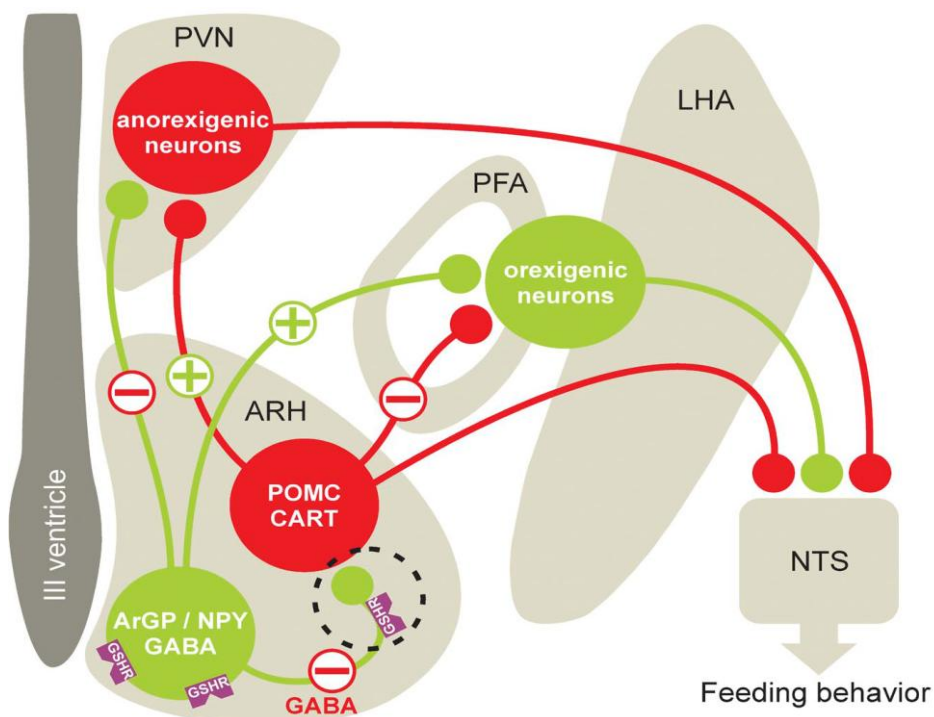
GHSR je receptor spřažený s G proteiny a aktivace GHSR-1a vede ke stimulaci fosfolipázy C, která generuje IP_3 a DAG. Výsledkem je vzestup intracelulární hladiny Ca^{2+} a excitační působení především na neurony hypotalamu, které řídí sekreci hormonů (Yamazaki a spol., 2012). Endokrinní role GHSR tedy spočívá především v indukování sekrece růstového hormonu z adenohypofýzy, ale i dalších hormonů – adrenokortikotropního, kortizolu a prolaktinu (Sato a spol., 2012).

Nejdůležitějším cílem ghrelinu uvolňovaného ze žaludku je aktivace GHSR-1a v nucleus arcuatus hypotalamu, čímž stimuluje pocit hladu a chuť k jídlu. Ghrelin podporuje žaludeční motilitu a sekreci žaludeční šťávy. Do mozku se přenáší buď přes hematoencefalickou bariéru nebo přes nervus vagus (Date a spol., 2002). Ghrelin reguluje vzestupem intracelulární hladiny Ca^{2+} v n. arcuatus GABAergní aktivitu neuronů, které následně stimulují neurony obsahující neuropeptid Y a agouti-related protein, čímž potencují jejich výlev. Neuropeptid Y i agouti-related protein jsou orexigenní a zprostředkovávají orexigenní efekt ghrelinu - ve výsledku snižují výdej energie a zvyšují příjem potravy (Chen a spol., 2004). Zároveň neurony z nucleus arcuatus nepřímo inhibují POMC neurony, čímž snižují výlev anorexigenních peptidů (Cowley a spol., 2003). Obě skupiny neuronů v n. arcuatus projikují do anorexigenního paraventriculárního jádra (PVN) v hypotalamu a do orexigenní laterální hypotalamické oblasti (LHA) (Obr. 4). Neurony s NPY/AgRP inhibují anorexigenní PVN jádro a aktivují orexigenní LHA jádro, POMC neurony fungují právě naopak. Ghrelin tedy přispívá ke zvětšování tukové tkáně skrze zvýšený příjem potravy.

Stimulační efekt na výlev ghrelinu má hlavně hladovění, naopak jeho hladina klesá po příjmu potravy. Nejvýznamnějším regulačním faktorem se zdá být hladina glukózy v krvi, např. žaludeční distenze na hladinu ghrelinu vliv nemá (Yildiz a spol., 2004). U potkanů byl objeven cirkadiánní vzorec sekrece ghrelinu, ve kterém vzestupy hladin korespondují s naučeným časem, kdy potkani pravidelně dostávali potravu a nejvyššího vzestupu hladiny se dosahuje zhruba 30 minut před pravidelnou dobou krmení. Potkani krmení *ad libitum* na rozdíl od potkanů krmených v pravidelném čase měli hladinu ghrelinu při hladovění daleko nižší (Drazen a spol., 2006).

U obézních lidí je hladina ghrelinu v plazmě snižena, u lidí s anorexií, malnutricí nebo kachexií je hladina naopak zvýšená (Haqq a spol., 2003). Zvažuje se také, jestli u obou extrémních stavů nedochází ke změnám v průchodnosti ghrelinu HEB, a zda se u obézních lidí nevyvíjí ghrelinová rezistence v důsledku snížené exprese GHSR-1a (Skibicka a Dickson,

2011; Naznin a spol., 2015). Exogenně podávaný ghrelin se ve studiích jeví jako bezpečný pro použití v klinické praxi a stává se tak kandidátem na léčbu deficece růstového hormonu, anorexie nebo kachexie (Akamizu a spol., 2004).



Obr. 4: Schéma neuronálního hypotalamického okruhu fungování GHSR-1a (WEISS, Norbert; ZAMPONI, Gerald W. All roads lead to presynaptic calcium channel inhibition by the ghrelin receptor: Separate agonist-dependent and-independent signaling pathways. The Journal of general physiology, 2015, 146.3: 201-204).

Z dalších účinků ghreluinu můžeme zmínit snižování arteriálního tlaku beze změny srdečního tepu, což se děje nejspíše přes působení na jádro solitárního traktu (Lin a spol., 2004). Ghrelin reguluje sekreci inzulinu v závislosti na hladině glukózy v krvi – při hyperglykémii pravděpodobně stimuluje inzulinový výlev a při hypoglykémii dochází k opačnému jevu (Reimer a spol., 2003). Byl prokázán i účinek ghreluinu na buněčnou proliferaci, kdy po systémovém podávání ghreluinu došlo k neurogenezi v hippocampu, ale paměť závislá na hippocampu ovlivněna nebyla (Zhao a spol., 2014).

Zatím máme jen malé znalosti o efektu ghreluinu na náladu a chování. U hlodavců exogenní ghrelin podaný centrálně vyvolal chování podobné úzkosti a depresi (Carlini a spol., 2004), zatímco u periferně podávaného ghreluinu jsou výsledky sporné (Asakawa a spol., 2001; Lutter a spol., 2008). Musíme ale také uvažovat fakt, že behaviorální odpověď na orexigenní peptidy se liší v závislosti na přítomnosti nebo absenci potravy (Rodgers a spol., 2002). O chronickém podávání ghreluinu víme ještě méně, zatím se ukazuje, že vyvolává behaviorální projevy

úzkosti a deprese (Hansson a spol., 2011). Práce E. Jerlhagové systematicky ukazují, že periferně podaný ghrelin indukuje lokomoční aktivitu, stimuluje dopaminergní systém a produkuje preferenci při CPP testu, takže by se mohl podílet při vzniku různých závislostí (Jerlhag, 2008; Jerlhag a spol., 2010). Ovšem existují i studie, které tvrdí, že ghrelin neměl vliv na lokomoční aktivitu, ani nevyvolal preferenci při CPP testu (Davis a spol., 2007), což jen potvrzuje to, že o vlivu ghrelu na behaviorální projevy nemáme dostatek informací.

2.1 Ghrelin a bolest

Mnoho orexigenních i anorexigenních peptidů (NPY, galanin, leptin) má více či méně známý účinek při modulaci bolesti (Yu a spol., 2004) a výjimkou není ani ghrelin. Naznačuje to i umístění GHSR receptorů ve specifických regionech mozku (hypotalamus, Varolův most, substantia nigra, n. raphe) a v dorzálních rožích míšních, což jsou vše oblasti řídící transmissi bolesti (Zigman a spol., 2006). Právě v dorzálních rožích míšních v laminách IV až VI ghrelin moduluje neurotransmisi a aktivuje antinocicepční okruh (Vergnano a spol., 2008).

Ukazuje se, že ghrelin (i neacylovaný ghrelin) by mohl zabraňovat rozvoji hyperalgie (Sibilia a spol., 2006; Sibilia a spol., 2012; Garcia a spol., 2008). Ale zatím není jasné, jakým mechanismem ke změně prahu bolesti dochází. Při snížené hladině ghrelu u obézních jedinců se práh bolesti snižuje – projevuje se hyperalgie, proto se předpokládá, že zde může nízká hladina ghrelu fungovat pronocicepčně (Guneli a spol., 2010a). Předpokládá se, že mechanismus fungování ghrelu může být prostřednictvím opioidního nebo kanabinoidního systému, potlačením neuroinflammace nebo vyvoláním neuroprotektce.

Ghrelin by mohl antinocicepční efekt zprostředkovávat skrze endogenní opioidní systém, ale zatím neznámo jak. Tento antinocicepční účinek ghrelu lze totiž blokovat antagonistou μ -opioidního receptoru – naloxonem (Wei a spol., 2013). Agonista μ -receptoru, β endorfin, je součástí endogenního antinocicepčního systému a aktivita jeho receptoru je modulována NO. Po zvážení faktu, že ghrelin aktivuje hypotalamickou NO syntázu, můžeme předpokládat, že se ghrelin zapojuje do antinocicepčního opioidního systému právě přes stimulaci NO syntázy (Gaskin a spol., 2003). Nebo další možností může být zvýšená exprese μ -receptoru po centrální administraci ghrelu (Skibicka a spol., 2011).

Endokanabinoidy hrají také důležitou roli při potlačování bolesti a je známa souvislost mezi nimi a ghrelinem, který předchází downregulaci endokanabinoidních receptorů (Burdyga a spol., 2006). Neuropeptid Y, jehož výlev je stimulovaný ghrelinem, indukuje míšní antinocicepci a reguluje přenos bolesti v mozku (Hua a spol., 1991). K dalším faktorům

modulující bolest a analgezii patří serotonin, jehož hladina v nucleus raphe a hypotalamu je ghrelinem snižována (Brunetti a spol., 2002; Carlini a spol., 2004).

Nesmíme zapomenout na protizánětlivý efekt ghrelu, který možná zprostředkovává antihyperalgezní účinek při zánětlivé bolesti a zamezuje dalšímu vývoji zánětu. Předpokládá se, že část antiinflamačního efektu je dána interakcí s centrálním opioidním systémem (Sibilia a spol., 2006). Ghrelin výrazně inhibuje v lymfocytech a monocytech expresi cytokinů IL-1 β , IL-6 a TNF- α (Dixit a spol., 2004) a také funkčně inhibuje NF- κ B, čímž dále potlačuje expresi TNF- α (Li a spol., 2004). Protizánětlivý efekt ghrelu může být blokován podáním jeho antagonisty (Zhou a spol., 2014). Působení ghrelu ve výsledku potlačuje zánětlivou bolest samotnou i jako součást neuropatické bolesti (Guneli a spol., 2007). Výše zmíněné cytokiny totiž značně přispívají k vývoji neuropatické bolesti (Verri a spol., 2006).

Při neuropatickém poškození může ghrelin působit neuroprotektivně, což bylo zaznamenáno u hippocampálního poškození (Xu a spol., 2009), dopaminergní neurodegenerace (Moon a spol., 2009), kortikálního ischemického/reperfúzního poškození mozku (Miao a spol., 2007) a u poškození sedacího nervu (Guneli a spol., 2010b). Pravidelné podávání ghrelu může zlepšit histologický vzhled poškozeného nervu, především regenerací myelinového obalu a axonu (Guneli a spol., 2010b).

Z daných faktů není pochyb o tom, že vztah mezi bolestí a ghrelinem existuje. Centrální inhibici bolesti s paralelním protizánětlivým působením ghrelu můžeme chápat jako adaptivní odpověď k předcházení abnormálnímu přenosu nociceptivních signálů za daného výživového stavu. Také může jít o funkční udržování odpovídajícího stavu bdělosti při hledání potravy v potenciálně nebezpečném prostředí (Rodgers a spol., 2002).

3 Preferenční metody

Pomocí preferenčních metod zjišťujeme preferenci nebo averzi pro určitý podnět u pokusných zvířat. Při přítomnosti bolesti se tyto preference můžou změnit. Podáním látek tišících bolest můžeme míru preference vrátit k původním hodnotám. Preferenční metody nám umožňují komplexně zkoumat subjektivní vnímání bolesti, odhalit spontánní bolesti nebo teplotní alodynii/hyperalgezi.

3.1 Metoda podmíněné preference místa (Condition Place Preference - CPP)

Použití metody CPP bylo původně navrženo pro studium drogové závislosti. Výzkumy používající metodu CPP dnes ale zahrnují nejen zkoumání bolesti, ale také studování neurotransmiterů, genové exprese, signalizačních drah a dalších mechanismů souvisejících s efektem odměny. **Obecně** hlavní tezí metody podmíněné preference místa je, že zmírnění bolesti představuje pro zvíře vždy odměnu prostřednictvím mesolimbického okruhu (Navratilova a spol., 2012). Vycházíme ze základního předpokladu, že zvíře tuto odměnu vyhledává, takže po podmiňování začne zvíře vyhledávat i specifické místo, kde ke zmírnění bolesti došlo. Pokud zvíře dostane možnost volby, bude vykazovat preferenci tohoto místa. Můžeme tak sledovat, zda různé látky dokážou zmírnit bolest (King a spol., 2009).

Metoda CPP se snaží vytvořit asociaci mezi úlevou od bolesti a specifickým místem, k čemuž dochází procesem **klasického podmiňování**, které rozpracoval I. P. Pavlov. Při klasickém podmiňování se zvíře učí, že dané podněty nepřicházejí náhodně, ale je mezi nimi závislost. Podmíněný podnět předchází v krátkém časovém intervalu nepodmíněnému podnětu (Pearce a Hall, 1980). Při metodě CPP používáme úlevu od bolesti jako nepodmíněný podnět a určité konkrétní místo jako podmíněný podnět (King a spol., 2009). Při zkoumání účinků drog pomocí preferenčních metod je zásadní, aby dané drogy neměly vliv na paměť a učení. Metoda CPP je uzpůsobena především k testování preference u laboratorních potkanů nebo myši.

Klasicky máme zařízení s dvěma odlišnými komorami. Zvířeti aplikujeme zkoumanou látku a po dobu jejího působení je zvíře pouze v jedné komoře. Po odeznění efektu látky se podá pouze fyziologický roztok a zvíře vložíme do druhé komory. Takto podmiňujeme několik dní. Na závěr měříme čas, který se zvíře vyskytuje v každé komoře, když má možnost volby.

Při použití **ve výzkumu bolesti** dochází ke dvěma zásadním změnám. Za prvé nevyužíváme (dávky) látky, které mají potenciál vyvolat závislost. Za druhé před podmiňováním musíme pocit bolesti určitým způsobem vyvolat. Při studiu akutní bolesti se nejčastěji používá injekce formalinu pod kůži před podáním zkoumané látky (Lei a spol., 2004). V popředí zájmu stojí dnes i bolesti modelované pomocí chemoterapeutik (Park a spol., 2013). Pokud chceme zkoumat neuropatické bolesti, tak se obvykle provádí chronická konstriktace sedacího nervu (Bennett a Xie, 1988). Při neuropatických bolestech se běžně projevuje bolest spontánní, čili na podnětu nezávislá bolest, kterou můžeme odhalit právě metodou CPP.

Alternativních možností využití metody CCP existuje hned několik. Můžeme ji použít pro porovnávání účinků dvou látek mezi sebou, kdy jednu drogu spárujeme s jednou komorou a obdobně druhou látku s opačnou komorou (Patkina a Zvartau, 1998). Další varianta metody CPP existuje při experimentálním studování oblastí mozku důležitých pro vnímání bolesti. Po vytvoření lézí v daných oblastech následně zjišťujeme, jak toto poškození zapůsobilo na percepci bolesti (Johansen a spol., 2001). Velmi kreativně metodu poupravil Nakashima a spol. (Nakashima a spol., 2015) pro zjišťování vzájemné vizuální komunikace o pocitu bolesti mezi jedinci u potkanů a následných behaviorálních dopadů. Při experimentu byly v jedné komoře fotografie potkanů trpících bolestí a v druhé komoře obrázky potkanů bez bolesti. Potkani se měli rozhodnout, v které komoře budou trávit svůj čas. Ve výsledku potkani preferovali komoru s obrázky svých druhů bez bolesti.

Metoda CPP má mnoho **výhod**. Za prvé závěrečné testování probíhá bez podání drogy, takže nedochází k ovlivnění motoriky zvířete, což by mohlo zkreslit výsledky. Za druhé je test CPP citlivý i k nízkým dávkám drogy a primárně nevyžaduje chirurgický zákrok (Carr a spol., 1989). Za třetí předností testu zůstává i to, že měří zároveň preferenci a averzi (Spina a spol., 2015). Za čtvrtou a hlavní přednost metody CPP se považuje možnost odhalit spontánní bolesti (Davoody a spol., 2011), které hlodavci svým chováním nedávají najevo (Stasiak a spol., 2003). Za páté test také pracuje s bolestí jako komplexním jevem, takže nám umožňuje zkoumat všechny dimenze bolesti zároveň, což většina klasických metod založených na reflexní odpovědi postrádá. Za poslední se ukázalo, že léky, které nepotlačují bolest u lidí, nevyvolají CPP ani u zvířat, tím pádem metoda CPP dosahuje klinicky validních výsledků (Navratilova a spol., 2013).

3.2 Metoda teplotní preference (Thermal Place Preference – TPP)

Metoda TPP zastupuje modifikaci plantar testu, s tím rozdílem, že nevyužívá reflexní odpověď, ale monitoruje se komplexní motorická odpověď, pro kterou jsou nutná vyšší nervová centra (Mauderli a spol., 2000). Průběh je takový, že pokusné zvíře vložíme do komory, která má jednu půlku podlahy averzivně teplou a druhou averzivně studenou, a zjišťujeme, na které podlaze se více zdržuje. Z toho zjišťujeme, která teplota je mu více nepříjemná a jestli se neprojevuje teplotní hyperalgie nebo alodynie. Na rozdíl od plantar testu můžeme u metody TPP použít nižších teplot a delšího působení a následně tak určovat citlivost aktivace nociceptorů (Vierck a spol., 2002). Pomocí metody TPP můžeme odhalit přítomnost evokovaných bolestí při teplotní stimulaci.

Při využití **ve výzkumu bolesti** postupujeme obdobně jako u metody CPP, kdy bolest modelujeme před závěrečnou fází testování a obdobným způsobem. Nejdříve se zajistí přibližně 50% obsazenost každé plotny, aby míra averze byla u ploten stejná. Následně můžeme podat látku působící na bolest a sledovat změny v teplotní preferenci. Pokud se například u pokusného zvířete v přítomnosti bolesti projeví tepelná preference a po aplikaci drogy tato preference zmizí, vyvodíme z toho, že látka pravděpodobně zajišťuje zmírnění bolesti. Při hodnocení je důležité si uvědomit, že metoda teplotní preference neměří skutečnou citlivost na teplotní podněty, ale pouze relativní teplotní citlivost (Walczak a Beaulieu, 2006).

Výhody metody TPP vyplývají hlavně z využití komplexní motorické odpovědi a možnosti rozhodování každého pokusného zvířete, z čehož můžeme zjistit něco více o emoční stránce bolesti. Také je zmírněn stres a jeho důsledky tím, že se zvíře v komoře volně pohybuje. Celkově metoda představuje významnou součást výzkumu detekce teploty, která je u savců kritickou funkcí pro udržení teplotní homeostáze (Colburn a spol., 2007).

CÍLE

Cílem našeho projektu bylo zjistit, zda chronické podávání ghrelinu ovlivní již plně rozvinutou neuropatickou bolest a zda dojde k antinocicepčnímu a/nebo analgetickému působení. Antinocicepční vliv jsme sledovali pomocí dvou velmi často používaných reflexních metod, a to Plantar testu a testu von Freyovými vlákny. Analgetický účinek jsme zjišťovali dvěma preferenčními metodami, tj. testem podmíněné preference místa (CPP) a testem teplotní preference (TPP).

MATERIÁL A METODY

Zvířata

Použili jsme 14 dospělých albinotických samců potkanů kmene Wistar (Velaz, Prague, Czech Republic) ve váhovém rozmezí 170 – 250 g starých přibližně 10 týdnů. Byli chováni ve skupinách v chovných nádobách s volným přístupem ke krmivu a vodě. Denní režim byl nastaven 12:12 světlo:tma. Teplotu prostředí jsme udržovali na $22 \pm 2^\circ\text{C}$ a relativní vlhkost $50 \pm 10 \%$. Aklimatizační doba byla 5 dnů. Všechny experimenty byly prováděny ve dne. Ghrelin nebo fyziologický roztok jim byly aplikovány vždy ve stejném objemu. Po skončení experimentů byli potkani dekapitováni a jejich krev byla použita na další výzkum. Pokusy byly provedeny v souladu s návodem Etické komise Mezinárodní společnosti pro studium bolesti (Zimmermann, 1983) a byly schváleny Odbornou komisí pro ochranu laboratorních zvířat 3. LF UK.

Ghrelin

Ghrelin byl zajištěn od společnosti Phoenix Pharmaceuticals, Inc., USA. Rozpuštěn byl ve fyziologickém roztoku (100 μg v 1 ml) a podáván v dávce 100 $\mu\text{g/kg}$ s.c.

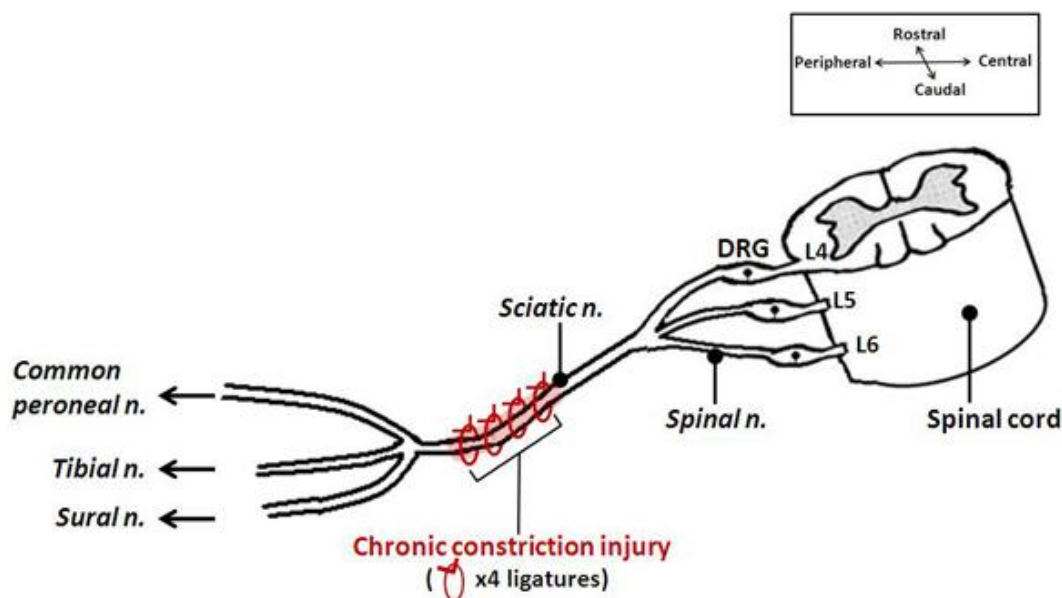
Protokol experimentu

Potkani byli rozděleni do dvou skupin – SHAM (zdánlivě operování, tj. vypreparování nervu, ale bez jeho podvazu) a CCI (operace s podvazem nervu). Sedm dní po operaci byl prokázán rozvoj neuropatické bolesti tak, že byly měřeny prahy bolesti na obou zadních končetinách u obou skupin potkanů. Ve stejný den ráno byla měřena také teplotní preference metodou TPP a základní preference pro test CPP. Odpoledne byla podána první dávka ghreluinu a začalo podmiňování pro CPP. Dvanáct dní po operaci (tj. pátý den podmiňování) jsme provedli závěrečné testování CPP. Následně jsme aplikovali poslední dávku ghreluinu a 30 min od podání jsme změřili TPP a 40 min od podání jsme měřili prahy bolesti.

Operace

Neuropatická bolest byla vyvolána chronickým podvazem sedacího nervu (CCI, Obr. 5) podle modelu Benetta a Xieho (Benetta a Xie, 1988). Anestezie byla vyvolána aplikací ketaminu/xylazinu (100 mg/kg a 16 mg/kg i.p.). Levá zadní noha byla oholena a oči byly lubrikovány oftalmologickou mastí. Zvíře bylo položeno na bok a vyholená oblast

vydezinfikována. Následně byl proveden řez kůže a svaly (m. gluteus superficialis a m. biceps femoris). Levý sedací nerv byl odhalen a podvázán čtyřmi ligaturami chromovým catgutem, ligatury byly lehce utaženy. Poté proběhlo šití svalů a kůže. Při probouzení z anestezie byli potkani sledováni. Skupina SHAM prošla stejnou operací kromě podvázání nervu.



Obr. 5: Schéma pozice ligatur sedacího nervu u CCI modelu bolesti (AUSTIN, Paul J.; WU, Ann; MOALEM-TAYLOR, Gila. Chronic constriction of the sciatic nerve and pain hypersensitivity testing in rats. *Journal of visualized experiments: JoVE*, 2012, 61).

Prahy bolesti

Tepelný práh bolesti

Tepelný práh bolesti byl stanoven jako latence únikového reflexu po nociceptivní tepelné stimulaci pomocí plantar testu (Plantar Test, Ugo Basile, Comerio, Italy). Plantar test se provádí tak, že zvíře umístíme do plastového boxu se skleněným dnem (Obr. 6) a necháme cca 10 min aklimatizovat. Využívá se tepelného stimulu ve formě paprsku, který je směřován na plantární stranu končetiny zvířete přes skleněné dno. Sledujeme únikovou obrannou reakci, kdy zvíře nejčastěji ucukne končetinou (Hargreaves a spol., 1988). Dobu latence změří přístroj sám optickými senzory, na nás je, abychom rozeznali obrannou odpověď od volných a náhodných motorických projevů. Díky plantar testu můžeme tedy zjišťovat míru působení analgetik, přítomnost hyperalgie a alodynie, průběh reflexní odpovědi a mnohé další jevy.

Před testováním je vhodné nastavit optimální intenzitu světelného paprsku dle doby latence, která by se měla pohybovat v rozmezí 7 až 10 vteřin. Tomu odpovídala intenzita o hodnotě 90. Taktéž byla nastavena horní hranice doby latence (cut off time), po jejímž uplynutí světelný paprsek zhasne, aby se předešlo poškození končetiny. V našem případě byl cut off time 22 s. Při opakovaném měření téže končetiny musíme dbát na dostatečný časový rozestup mezi jednotlivými měřeními, takže jsme mezi třemi po sobě jdoucími měřeními

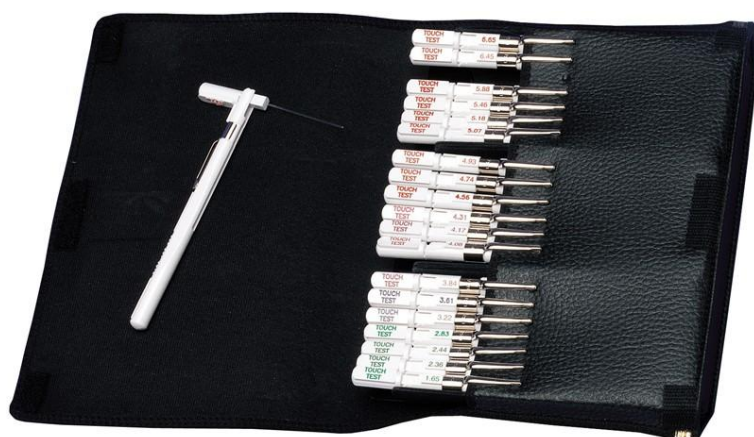


nechali 5min rozestupy. Čas latence u obou zadních končetin byl měřen v náhodném pořadí. Pro statistickou analýzu byly použity průměrné hodnoty z třech měření.

Obr. 6: Zařízení pro plantar test.

Mechanický práh bolesti

Mechanický práh bolesti byl stanoven pomocí von Freyových vláken (Obr. 7). Jde o vlákna vyrobená z nylonu ve škále různých průměrů, tím pádem se liší i ve velikosti jimi vyvolaného tlaku při ohnutí (Bell-Krotoski a Tomancik, 1987). Vláknem tlačíme na kůži



zvířete, dokud se vlákno neohne, a sledujeme, zda dojde k vyvolání obranného reflexu. Pokud k takové odpovědi došlo, bylo měření se stejným vláknem znovu opakováno.

Obr. 7: Von Freyova vlákna (<http://www.stoeltingco.com/anymaze/pain/pain-analgesia/touch-test.html>)

Jestliže se situace opakovala ještě dvakrát za sebou, byla tloušťka vlákna považována za odpovídající mechanickému prahu bolesti a hodnota daného vlákna byla zaznamenána. Vždy se postupovalo od nejtenčího vlákna po nejtlustší vlákno a působili jsme jimi na nárt zadní končetiny mezi 2. a 3. prstem.

Teplotní preference

Pomocí metody TPP byla stanovena teplotní alodynie jako operantní odpověď na evokovanou stimulaci. Teplotní alodynie se projevowała jako signifikantně vyšší preference pro jednu plotnu. **Aparát** pro testování (viz obr. 8) se skládá z komory, kde podlahu tvoří dvě



hliníkové plotny, které jsou navzájem oddělené tenkou vrstvou izolantu, aby nedocházelo k přenosu tepla. Na zařízení regulujeme teplotu ploten, kdy jednu zahříváme a druhou ochlazujeme na požadovanou teplotu. Nad komorou se nachází kamera, která měří dobu výskytu zvířete na obou plotnách. Bylo použito testovací zařízení pro TPP metodu (Bioseb, France) s kamerou sledující výskyt zvířete.

Obr. 8: Zařízení pro testování TPP.

Testovací proces začíná **fází habituace**, kdy si zvířata zvykají na měřicí komoru. Fáze trvá 10 min a teplotu obou ploten seřídíme na neutrální hodnotu, nejlépe na teplotu končetin. Při habituaci můžeme také sledovat čas strávený na každé plotně, z čehož zjistíme, základní míru preference pro obě plotny (Tian a spol., 2015). Dále postupujeme do **fáze před testováním**, kdy se nastavuje optimální rozmezí testovacích teplot. Dosahuje se toho postupnou změnou teplot na každé plotně, přičemž se jedna plotna ochlazuje a druhá zahřívá. Cílem je dosažení rovnoměrné obsazenosti ploten – přibližně 50% preference každé plotny (Vierck a spol., 2002). Při tom by tepelný ani chladový podnět neměl působit bolest. Významem této fáze je, aby míra averze byla na začátku pokusu u kontrolních zvířat shodná pro obě teploty. Po této fázi jsme provedli ještě 10min měření s již nastavenými konečnými teplotami, aby se zvířata

naučila řešit konflikt dvou nepříjemných stimulů (Kline a spol., 2015). V **závěrečné fázi** testování jsou teploty ploten nastaveny na hodnoty zjištěné při fázi před testováním (v našem případě 5°C a 45°C). Zvířata vkládáme do prostřed ploten. Doba strávená na každé plotně a počet přechodů mezi nimi byly automaticky zaznamenávány po dobu 10 min. Doba strávená mezi plotnami byla vyloučena. Z naměřených dat vyhodnotíme míru preference pro každou plotnu a tím pádem pro každou teplotu. Čas obsazenosti byl přepočten na procenta pro grafické znázornění a pro výpočet se použily absolutní časy.

Podmíněná preference místa

Účinek ghrelinu na spontánní bolesti byl testován pomocí metody CPP. **Zařízení** pro testování CPP sestává z boxu rozděleného do tří komor, kdy dvě komory se nachází na vnějších stranách a třetí komora je uprostřed. Všechny komory jsou vzájemně oddělitelné přepážkami. Vnější komory mají rozdílný design, aby zvíře dokázalo odlišit, ve které z nich se právě nachází a mohlo tak dojít k vytvoření asociace mezi odměnou a jednou z komor. Komory odlišujeme barvou zdí a strukturou podlahy (viz Obr. 9). Prostřední komora nemá žádné speciální znaky, protože v ní nevytváříme žádné asociace. Minimalizovali jsme rušivé podněty z okolí (hluk, světlo, průvan, pachy), které mohou narušit rovnoměrnou preferenci komor před testováním (Cunningham a spol., 2006). Použili jsme na zakázku vyrobený tříkomorový aparát pro testování CPP. Dvě postranní komory jsou odlišeny bílo-černým



pruhováním zdí, kdy v jedné jsou vertikální pruhy a v druhé horizontální. Dále se liší taktilními stimuly - velikostí ok v podlážce (3 mm vs. 5 mm). Prostřední komora je neutrální, šedá a je umístěna mezi postranními komorami. Výskyt zvířete měří fotosenzory automaticky.

Obr. 9: Komorové zařízení pro použití metody CPP.

Metoda CPP měla několik **fází**, které šly za sebou následovně - habituace, testování před podmiňováním, podmiňování a závěrečné testování (Obara a spol., 2013). **Habituaci** provádíme proto, aby si zvíře zvyklo na komorové zařízení, zmírnil se u něj stres a redukovala se tak variabilita způsobená neznámým prostředím. Habituace probíhala po 3 dny, od čtvrtého dne po operaci do sedmého dne po operaci. Potkani měli volný přístup po celém zařízení po dobu 20 min každý den.

Fázi habituace jsme zakončili fází **testování před podmiňováním**. Při tomto testování se opět zvíře pohybuje po celém zařízení po dobu 15 min a automaticky je zaznamenáván čas, který zvíře setrvá v každé z postranních komor. Toto testování nám umožní zjistit základní preference místa pro každé jednotlivé zvíře, která by v ideálním případě neměla být signifikantní pro žádnou komoru (Okun a spol., 2011). Daná fáze proběhla sedmý den po operaci. Podle základní preference jsme prováděli podmiňování ghrelinu u méně bazálně preferované komory.

Další fází je fáze **podmiňování**. Při ní necháme zvíře po stanovenou dobu (většinou po dobu účinku látky) v této komoře, ve které by měla podaná droga účinkovat, tedy zmírnit (nebo zhoršit) bolest a tím vyvolat preference nebo averzi. Po dostatečně dlouhé době, po které odezní efekt drogy, aplikujeme zvířeti pouze fyziologický roztok a vložíme ho do opačné komory, která je opět oddělená a zvíře v ní setrvá přibližně stejnou dobu, jako v komoře asociované s drogou. Tento postup opakujeme několik dní v závislosti na tom, o jakou drogu se jedná (Cunningham a spol., 2006). Když se jedná o látku s pomalým nástupem a dlouhou dobou účinku, pak se preference dosahuje hůře a je nezbytné se podmiňování věnovat více dní než při použití drog, které působí rychle. Také interval mezi administrací látky a umístěním do komorového zařízení by neměl být příliš dlouhý, jinak nemusí ke vzniku preference vůbec dojít (Cunningham a spol., 2002; Ettenberg a spol., 1999). Fáze podmiňování probíhala po 4 dny. Ráno byl zvířatům aplikován fyziologický roztok a odpoledne (min. 6 hodin po předchozím podmiňování) byl aplikován ghrelin. Potkani byli ihned po aplikaci látky umístěni do odpovídající komory bez přístupu do ostatních komor na 1 hodinu.

Jako poslední krok provádíme **závěrečné testování** a to v den po skončení podmiňování. Průběh je totožný jako při měření bazální preference. Zvířeti nepodáváme žádnou látku a může se volně pohybovat po zařízení. Závěrečné testování proběhlo 12. den po operaci. Potkany jsme umísťovali do prostřední neutrální komory a měli přístup do ostatních komor. Čas strávený v komorách jsme měřili po dobu 15 min. Na základě změny poměru obsazenosti komor od bazální preference vyvodíme, jaký měla látka účinek.

Statistika

Statistickou analýzu jsme prováděli pomocí programu Statistica 6.0 (StatSoft In., USA) a MS Office Excel 2007 s rozšířením Analýza dat. Rozdíly mezi CCI a SHAM skupinou u prahů bolesti před a po podání ghrelinu byly stanoveny pomocí dvoufaktorového ANOVA testu (skupina x končetina) v programu Statistica. Pro porovnání mechanických prahů bolesti z von Freyova testu mezi skupinami CCI a SHAM před léčbou ghrelinem jsme použili jednofaktorovou ANOVA analýzu v MS Office Excel. Pro CPP a TPP experimenty byla data analyzována před a po administraci/podmiňováním s využitím dvoufaktorového ANOVA testu (skupina x komora/plotna) v programu Statistica. K analýze účinku ghrelinu na TPP jsme použili dvoufaktorový ANOVA test (ghrelin x plotna) v programu Statistica. K analýze účinku ghrelinu na CPP jsme použili dvoufaktorový ANOVA test (ghrelin x skupina) v programu Statistica. Po všech ANOVA analýzách následoval Fisherův post-hoc test v programu Statistica. Wilcoxonův test v programu Statistica byl použit pro hodnocení teplotní preference a preference místa v rámci CPP a TPP skupin. Statistická signifikance byla stanovena jako $p < 0,05$; data jsou vyjádřena jako průměr \pm směrodatná odchylka.

VÝSLEDKY

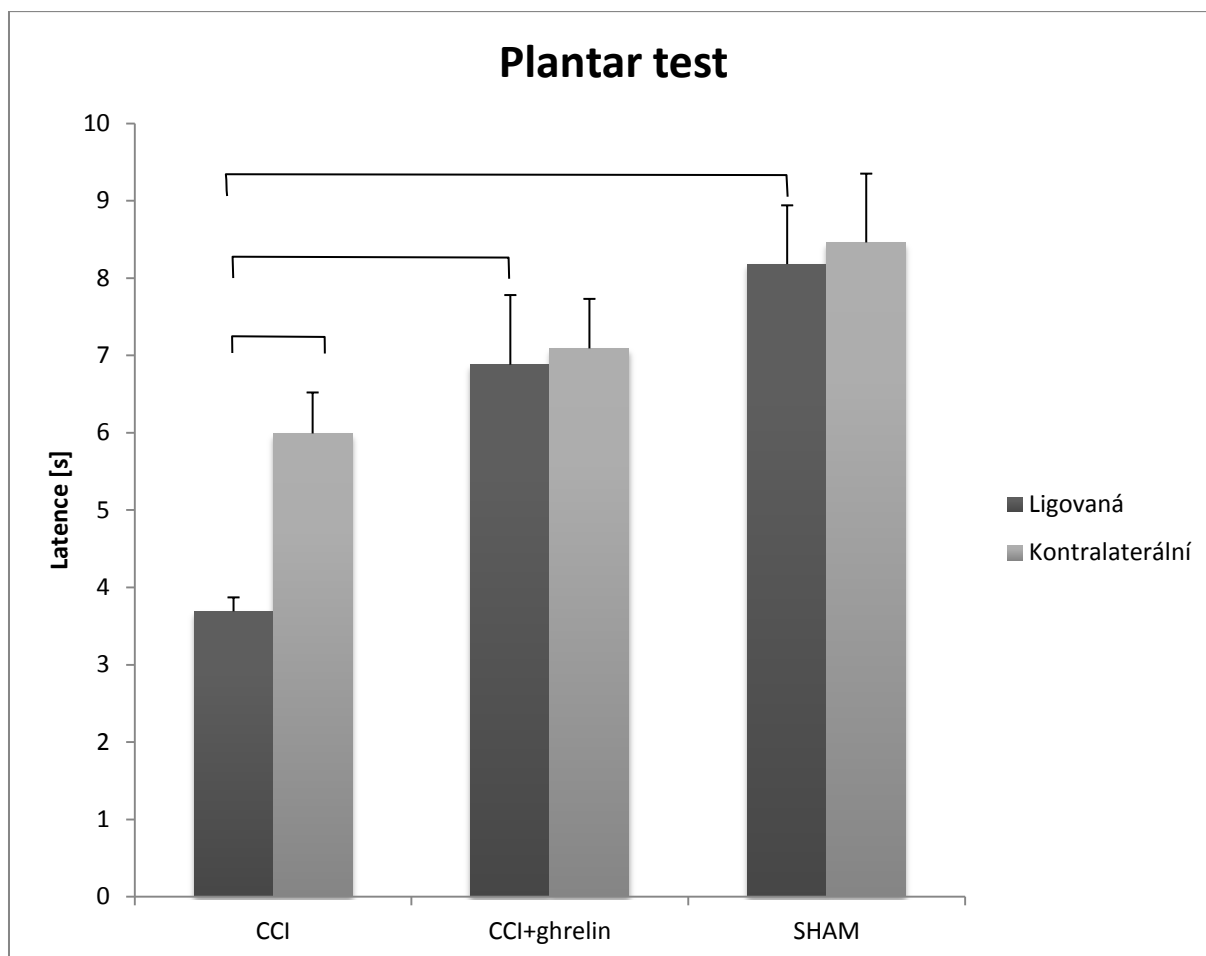
1 Prahy bolesti

Plantar test – tepelný práh bolesti (Graf 1)

Tepelný práh bolesti byl měřen 7 dnů po operaci na prokázání efektu operace – podvazu sedacího nervu. Práh byl měřen na obou zadních končetinách u skupiny CCI a SHAM potkanů. Průměrná latence obranné reakce ligované končetiny na tepelnou stimulaci u skupiny CCI byla $3,69 \text{ s} \pm 0,18$. Průměrná latence na kontralaterální končetině u skupiny CCI byla $5,99 \text{ s} \pm 0,53$. Průměrná latence obranné reakce zdánlivě operované končetiny u skupiny SHAM byla $8,18 \text{ s} \pm 0,76$. Průměrná latence na kontralaterální končetině u skupiny SHAM byla $8,46 \text{ s} \pm 0,89$. Porovnání mezi oběma skupinami a mezi levou a pravou končetinou pomocí ANOVA analýzy ukázalo, že interakce faktorů skupina x končetina mezi CCI a SHAM skupinou vykazovala signifikantní rozdíl [$F(1, 3) = 96,5$; $p = 0,002$]. Při porovnání latencí na podvázané a nepodvázané končetině u skupiny CCI pomocí post-hoc analýzy jsme ukázali, že latence obranné reakce byla signifikantně kratší na podvázané končetině než na kontralaterální končetině ($3,69 \text{ s} \pm 0,18$ a $5,99 \text{ s} \pm 0,53$; v daném pořadí $p < 0,001$). Při porovnání latencí na podvázané končetině skupiny CCI a operované končetině skupiny SHAM pomocí post-hoc testu jsme ukázali, že latence podvázané končetiny byla signifikantně kratší než latence operované končetiny ($3,69 \text{ s} \pm 0,18$ a $8,18 \text{ s} \pm 0,76$; v uvedeném pořadí $p < 0,001$). Při porovnání latencí obranné reakce na zdánlivě operované a kontralaterální končetině u skupiny SHAM pomocí post-hoc testu jsme nenalezli žádný významný rozdíl ($8,18 \text{ s} \pm 0,76$ a $8,46 \text{ s} \pm 0,89$; v uvedeném pořadí $p > 0,05$).

Dvanáct dní po operaci jsme opět zjišťovali tepelný práh bolesti, abychom odhalili vliv pětidenní aplikace ghrelinu. Měření proběhlo 30 min po páté, poslední aplikaci ghrelinu. Průměrná latence obranného reflexu u ligované končetiny u skupiny CCI byla $6,88 \text{ s} \pm 0,90$. Průměrná doba do vyvolání reflexní odpovědi u kontralaterální končetiny u skupiny CCI byla $7,09 \text{ s} \pm 0,64$. U skupiny SHAM byla průměrná latence u operované končetiny $7,48 \text{ s} \pm 0,40$. Průměrná doba do vyvolání reflexu na kontralaterální končetině u skupiny SHAM dosahovala $6,48 \text{ s} \pm 0,44$. Nenalezli jsme žádný rozdíl mezi latencemi po podávání ghrelinu u CCI a SHAM skupiny ve faktorech skupina x končetina [$F(1, 4) = 0,364$; $p = 0,57$] po ANOVA analýze. Post-hoc analýza ukázala, že hodnoty latence obranné reakce se neliší u podvázané a kontralaterální končetiny u skupiny CCI po podávání ghrelinu ($6,88 \text{ s} \pm 0,90$ a $7,09 \text{ s} \pm 0,64$; v daném pořadí $p > 0,05$). Doba latence obranného reflexu u skupiny CCI u podvázané

končetiny se zvýšila při porovnání s hodnotami před léčbou ghrelinem ($6,88 \text{ s} \pm 0,90$ a $3,69 \text{ s} \pm 0,18$; v daném pořadí $p = 0,02$).

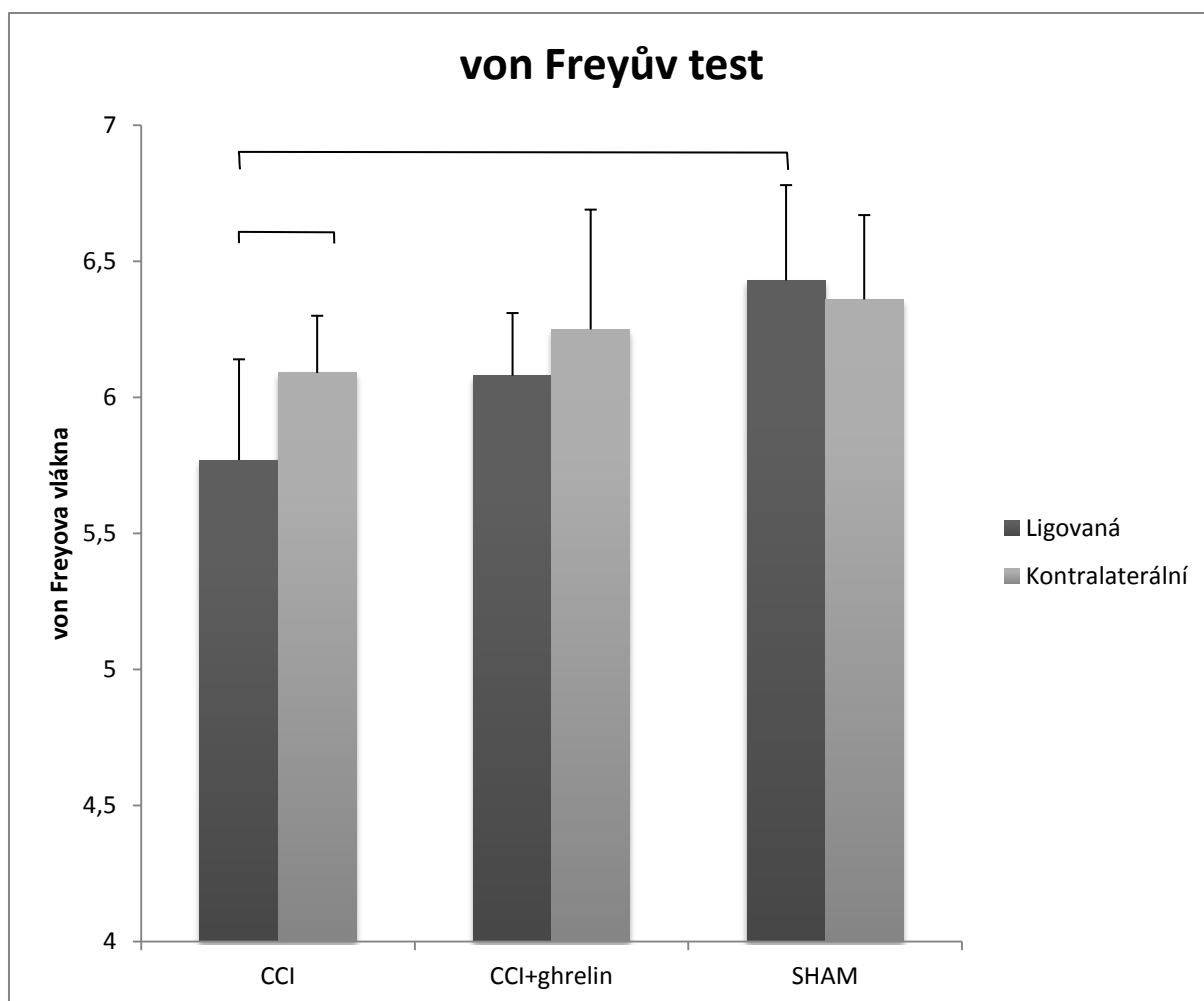


Graf 1: Latence obranného reflexu u plantar testu před a po podávání ghreluinu u skupiny CCI a u skupiny SHAM. Po podvazu končetiny (CCI) měla podvázaná končetina kratší latenci v porovnání s kontralaterální končetinou ($p = 0,001$) a při porovnání s operovanou končetinou bez podvazu u skupiny SHAM také ($p = 0,001$). Doba latence obranného reflexu u skupiny CCI u podvázané končetiny se zvýšila při porovnání s hodnotami před léčbou ghrelinem ($p = 0,02$). Data jsou vyjádřena jako průměr \pm směrodatná chyba průměru a spojnice označují $p < 0,05$.

Von Frey test – mechanický práh bolesti (Graf 2)

Sedm dní po operaci jsme zjišťovali mechanické prahy bolesti pomocí von Freyových vláken. Práh byl měřen na obou zadních končetinách u skupiny CCI a SHAM potkanů. Průměrná hodnota von Freyových vláken u podvázané končetiny u skupiny CCI byla $5,77 \pm 0,37$. Průměrná hodnota mechanického prahu bolesti kontralaterální končetiny u skupiny CCI dosahovala $6,09 \pm 0,21$. Průměrná hodnota von Freyových vláken u operované končetiny u skupiny SHAM byla $6,43 \pm 0,35$. Průměrná hodnota mechanického prahu bolesti na kontralaterální končetině u skupiny SHAM dosahovala $6,36 \pm 0,31$. Jednofaktorová ANOVA analýza prokázala signifikantní rozdíl mezi CCI a SHAM skupinou [$F = 5,515$; $p = 0,006$]. Post-hoc analýza ukázala, že hodnota prahu bolesti je signifikantně nižší u podvázané končetiny potkanů skupiny CCI než u operované končetiny ve skupině SHAM ($5,77 \pm 0,37$ a $6,43 \pm 0,35$; v daném pořadí $p = 0,018$). Signifikantně vyšlo také porovnání podvázané a kontralaterální končetiny u skupiny CCI ($5,77 \pm 0,37$ a $6,09 \pm 0,21$; v daném pořadí $p = 0,002$).

Dvanáctý den po operaci jsme opět zjišťovali mechanické prahy bolesti pomocí von Freyových vláken. Měření probíhalo 40 min po aplikaci ghrelinu. Průměrná hodnota von Freyových vláken u podvázané končetiny u skupiny CCI byla $6,08 \pm 0,23$. Průměrná hodnota mechanického prahu bolesti kontralaterální končetiny u skupiny CCI dosahovala $6,25 \pm 0,44$. Průměrná hodnota von Freyových vláken u operované končetiny u skupiny SHAM byla $6,39 \pm 0,28$. Průměrná hodnota mechanického prahu bolesti na kontralaterální končetině u skupiny SHAM dosahovala $6,18 \pm 0,44$. ANOVA analýza neprokázala signifikantní rozdíl v interakci skupina x končetina mezi CCI a SHAM skupinou po léčbě ghrelinem [$F(1, 3) = 3,215$; $p = 0,171$]. Post-hoc analýza ukázala, že hodnota prahu bolesti se neliší u podvázané končetiny a u kontralaterální končetiny ve skupině CCI ($6,08 \pm 0,23$ a $6,25 \pm 0,44$; v daném pořadí $p = 0,594$). Při porovnání hodnot vláken u podvázané končetiny skupiny CCI a operované končetiny u skupiny SHAM post-hoc analýza také neprokázala signifikantní rozdíl ($6,08 \pm 0,23$ a $6,39 \pm 0,28$; v daném pořadí $p = 0,884$). Post-hoc analýza neprokázala signifikantní rozdíl prahů bolesti u podvázané končetiny skupiny CCI před a po léčbě ghrelinem ($5,77 \pm 0,37$ a $6,08 \pm 0,23$; v daném pořadí $p = 0,213$).

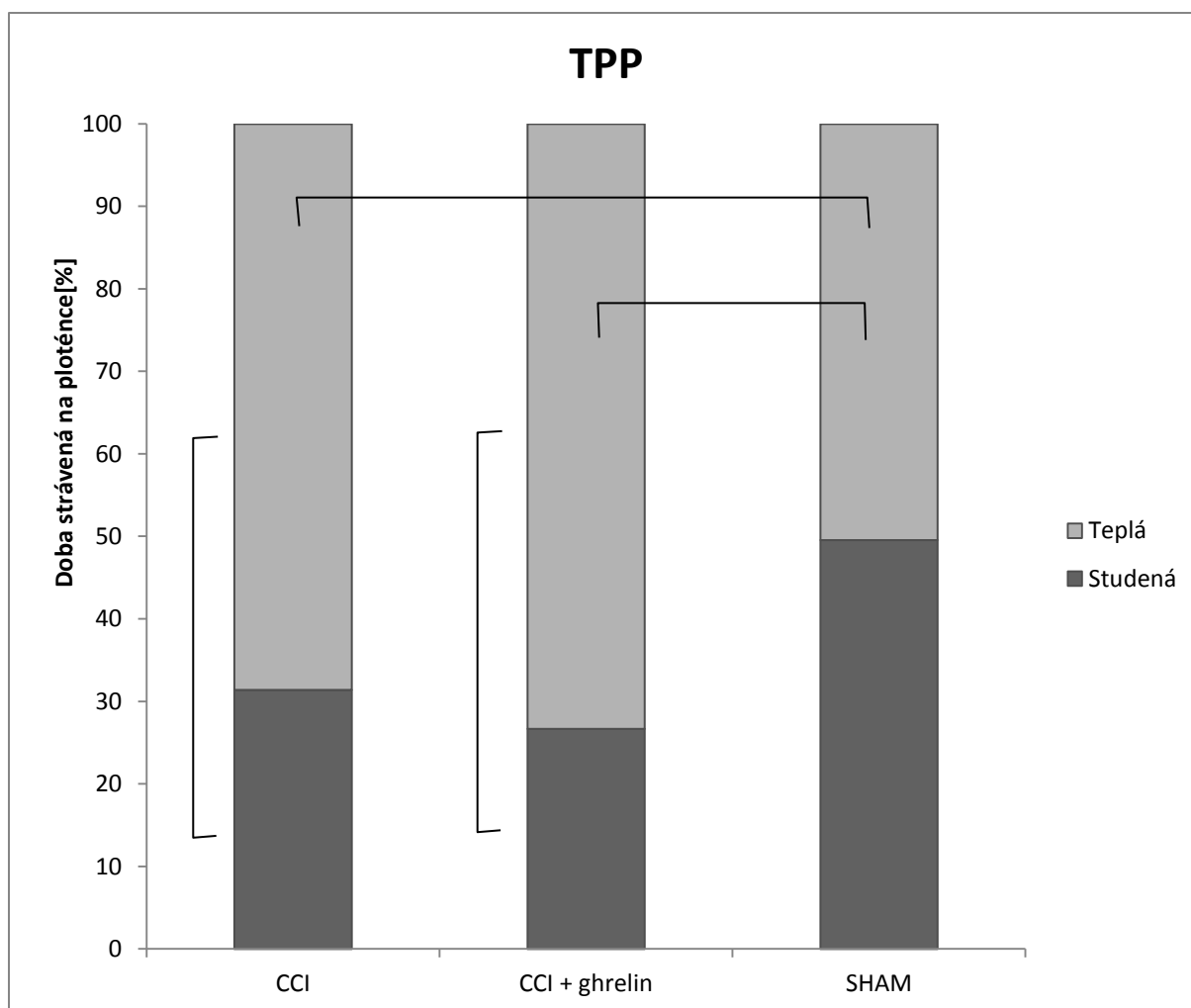


Graf 2: Mechanické prahy bolesti stanovené pomocí von Freyových vláken u skupiny CCI před a po léčbě ghrelinem a u skupiny SHAM. Po operaci se u podvázané končetiny u skupiny CCI snížily mechanické prahy bolesti v porovnání s nepodvázanou končetinou stejné skupiny ($p = 0,002$). Podvázaná končetina CCI potkanů měla také nižší práh v porovnání s operovanou končetinou skupiny SHAM ($p = 0,018$). Po léčbě ghrelinem se tyto rozdíly vyrovnaly a neprokázal se žádný signifikantní rozdíl jak mezi končetinami, tak mezi skupinami. Data jsou vyjádřena jako průměr \pm směrodatná chyba průměru a spojnice označují $p < 0,05$.

2 Teplotní preference (Graf 3)

Sedm dní po operaci jsme měřili teplotní preferenci u skupiny CCI i SHAM, abychom zjistili, jaký dopad měla operace na teplotní preferenci. Skupina CCI se zdržovala na teplé plotně v průměru $412,0 \text{ s} \pm 22,6$. Na studené plotně byla skupina CCI v průměru $132,0 \text{ s} \pm 29,7$. Skupina SHAM se na teplé plotně zdržovala v průměru $329,8 \text{ s} \pm 21,2$. Na studené plotně byla skupina SHAM v průměru $248,6 \text{ s} \pm 19$. Vztah mezi faktory skupina x plotna pomocí ANOVA analýzy vykazoval signifikantní rozdíl mezi CCI a SHAM skupinou [$F(1, 4) = 14,88$; $p = 0,01$]. Post-hoc analýza ukázala, že CCI potkani strávili signifikantně méně času na studené plotně ($132 \text{ s} \pm 29,7$) než na teplé plotně ($412 \text{ s} \pm 22,6$; $p = 0,001$). V porovnání s obsazeností studené plotny skupinou SHAM ($248,6 \text{ s} \pm 19$) a studené plotny skupinou CCI post-hoc analýza odhalila také signifikantní rozdíl ($132 \text{ s} \pm 29,7$; $p = 0,03$). Toto zjištění bylo ověřeno pomocí Wilcoxonova testu, kde se ukázala signifikantní preference teplé plotny u skupiny CCI ($p = 0,04$), ale nikoliv u skupiny SHAM.

Dvanáct dní po operaci jsme opět zjišťovali teplotní preferenci, abychom odhalili dopad pětidenní aplikace ghrelinu. Měření proběhlo 50 min po páté aplikaci ghrelinu u skupin CCI i SHAM. Skupina CCI se zdržovala na teplé plotně v průměru $337,8 \text{ s} \pm 46,9$. Na studené plotně byla skupina CCI v průměru $193,0 \text{ s} \pm 47,1$. Skupina SHAM se na teplé plotně zdržovala v průměru $233,2 \text{ s} \pm 26,5$. Na studené plotně byla skupina SHAM v průměru $343,0 \text{ s} \pm 28,2$. Interakce faktorů skupina x plotna pomocí ANOVA analýzy vykazovala signifikantní rozdíl mezi CCI a SHAM skupinou [$F(1, 5) = 18,73$; $p = 0,007$]. Post-hoc analýza ukázala, že CCI potkani strávili signifikantně méně času na studené plotně než na teplé plotně ($337,8 \text{ s} \pm 46,9$ a $193 \text{ s} \pm 47,1$; v daném pořadí $p = 0,01$). Toto zjištění bylo ověřeno pomocí Wilcoxonova testu, kde se ukázala signifikantní preference pro teplou plotnu u CCI skupiny ($p = 0,04$). Post-hoc analýzou jsme také zjistili, že CCI potkani se signifikantně méně zdržovali na studené plotně než potkani ve skupině SHAM ($193,0 \text{ s} \pm 47,1$ a $343,0 \text{ s} \pm 28,2$; v daném pořadí $p = 0,01$). Interakce faktorů ANOVA analýzou ghrelin x plotna [$F(1, 4) = 0,52$; $p = 0,5$] při porovnání hodnot před a po léčbě ghrelinem u CCI skupiny nebyla nesignifikantní.

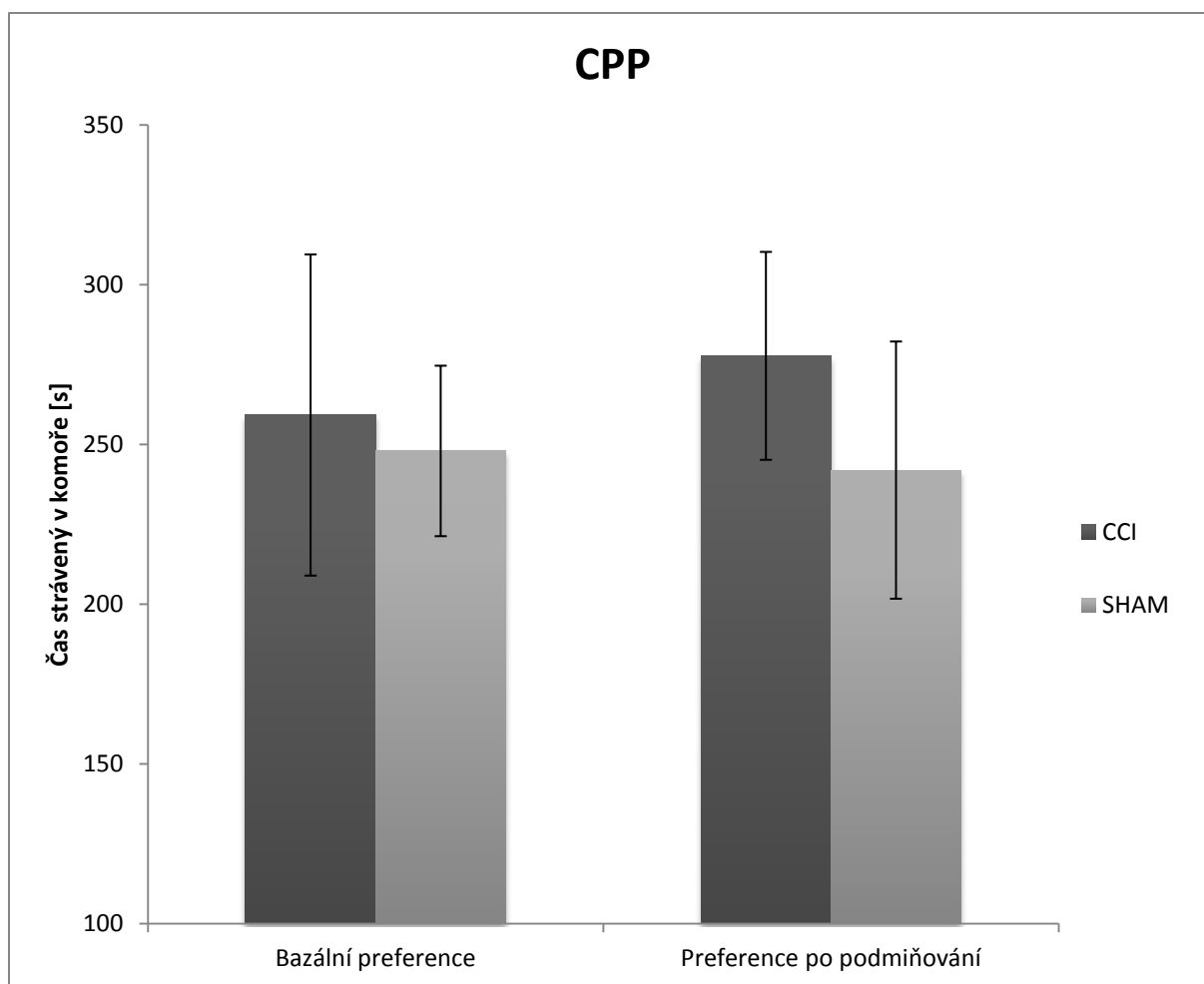


Graf 3: Teplotní preference u potkanů skupiny CCI před a po léčbě ghrelinem a u skupiny SHAM. Vertikální osa zobrazuje procentuální čas strávený na teplé a studené plotně u obou skupin potkanů. Potkani po podvazu nervu (CCI) strávili méně času na studené plotně v porovnání se stráveným časem na teplé plotně ($p = 0,001$). Při porovnání s obsazeností studené plotny skupinou SHAM a skupinou CCI se také projevil signifikantní rozdíl ($p = 0,03$). SHAM skupina nevykazovala žádnou preferenci ani pro jednu z ploten. Všechny preference zůstaly nezměněny po aplikaci ghrelu. Data jsou vyjádřena jako průměr \pm směrodatná chyba průměru a spojnice označují $p < 0,05$.

3 Podmíněná preference místa (Graf 4)

Sedm dní po operaci jsme zjišťovali bazální preferenci pro obě komory u obou skupin potkanů (CCI i SHAM). Skupina CCI strávila průměrně 259,25 s \pm 58,03 v komoře následně asociované s ghrelinem a 404,50 s \pm 55,42 v komoře neasociované. Skupina SHAM strávila v průměru 248,0 s \pm 30,80 v komoře asociované s ghrelinem a 339,25 s \pm 77,76 v komoře neasociované s ghrelinem. Obsazenost komor asociovaných s ghrelinem mezi CCI a SHAM skupinou se nelišila podle ANOVA analýzy interakce faktorů skupina x komora [$F(1, 3) = 0,309$; $p = 0,6$]. Post-hoc test ukázal, že se obsazenost komory asociované a komory neasociované s ghrelinem u skupiny CCI mezi sebou nelišila (259,25 s \pm 58,03 a 404,50 s \pm 55,42; v daném pořadí $p = 0,12$). Také bazální preference komor u skupiny SHAM se mezi komorami nelišila (248,0 s \pm 30,80 a 339,25 s \pm 77,76; v daném pořadí $p = 0,27$). Tento poznatek byl ověřen pomocí Wilcoxonova testu, kde se žádná preference neprokázala.

Závěrečné testování proběhlo dvanáct dní po operaci, tj. 1 den po podmiňování. Obsazenost komory asociované s ghrelinem u skupiny CCI dosáhla 277,75 s \pm 37,57. Čas strávený v komoře neasociované s ghrelinem u skupiny CCI byl 492,5 s \pm 34,04. Obsazenost komory asociované s ghrelinem u skupiny SHAM byla 242,0 s \pm 46,47. Čas strávený v komoře neasociované s ghrelinem u skupiny SHAM byl 440,0 s \pm 35,36. Interakce faktorů skupina x komora pomocí ANOVA analýzy mezi CCI a SHAM skupinou nebyla signifikantní [$F(1, 3) = 0,02$; $p = 0,89$]. Post-hoc analýza ukázala, že obsazenost komory asociované s ghrelinem a komory neasociované s ghrelinem u skupiny CCI nevykazovala signifikantní rozdíl (277,75 s \pm 37,57 a 492,5 s \pm 34,04; v daném pořadí $p = 0,08$). Obsazenost komory asociované s ghrelinem a komory neasociované u skupiny SHAM při post-hoc testu nevykazovala signifikantní rozdíl (242,0 s \pm 46,47 a 440,0 s \pm 35,36; v daném pořadí $p = 0,09$). U obou skupin se tedy neprokázala preference pro komoru neasociovanou s ghrelinem. Při porovnání hodnot před podmiňováním a po podmiňování se preference komory asociované s ghrelinem nelišila jak u skupiny CCI (259,25 s \pm 58,03 a 277,75 s \pm 37,57; v daném pořadí $p = 0,81$), tak i u skupiny SHAM (248,0 s \pm 30,80 a 242,0 s \pm 46,47; v daném pořadí $p = 0,94$). Zjištění bylo podpořeno Wilcoxonovým testem, kde jsme nezjistili žádnou preferenci. Ani interakce faktorů ghrelin x skupina [$F(1, 3) = 0,54$; $p = 0,83$] v porovnání hodnot pomocí ANOVA analýzy u komory asociované s ghrelinem před a po podmiňování u obou skupin CCI a SHAM nebyla signifikantní.



Graf 4: Podmíněná preference místa před a po podmiňování ghrelinem u skupiny CCI a u skupiny SHAM. Vertikální osa znázorňuje čas strávený v komoře asociované s ghrelinem. Bazální preference před podmiňováním ghrelinem se u skupiny CCI ani u skupiny SHAM nelišila. Po podmiňování ghrelinem se nevytvořila signifikantní preference nebo averze místa a obsazenosti komor zůstaly tedy nezměněny u obou skupin. Data jsou vyjádřena jako průměr \pm směrodatná chyba průměru a spojnice označují $p < 0,05$.

DISKUZE

V této studii jsme srovnali účinek ghreluinu u neuropatického modelu bolesti s rozvinutými symptomy pomocí dvou druhů metod. Prvním typem byly metody založené na měření latence obranného únikového reflexu končetiny. Druhý typ představovaly metody založené na sledování operantní motorické odpovědi. Po rozvinutí neuropatické bolesti z podvazu sedacího nervu jsme zjistili, že se u podvázané končetiny snížila hodnota latence obranného reflexu jak po tepelné stimulaci, tak po stimulaci mechanické. Také se změnila teplotní preference, kdy se potkani s neuropatickou bolestí vyhýbali studené plotně, resp. se zdržovali především na teplé plotně.

Po opakovaném podávání ghreluinu jsme odhalili, že se latence obranného reflexu po tepelné i mechanické stimulaci zvýšila a dosahovala tak stejných hodnot jako u skupiny bez neuropatické bolesti. Nicméně podávání ghreluinu nemělo vliv na teplotní preferenci, která zůstala nezměněna. Rovněž se nevyvinula preference místa po podmiňování ghrelinem u žádné skupiny.

1 Vliv CCI na reflexní odpověď

Je prokázáno, že se po CCI u potkanů sníží doba latence obranného reflexu (Bennett a Xie, 1988). Tento pokles latence při plantar testu se tradičně interpretuje jako tepelná hyperalgie (Bennett a Xie, 1988; Zhou a spol., 2014), u von Freyova testu jako mechanická alodynie (Howard a spol., 2005). Naše výsledky vlivu CCI na tepelný a mechanický práh bolesti odpovídají předchozím zjištěním (Datta a spol., 2010; Bennett a Xie, 1988; Zhou a spol., 2014).

Ovšem u výsledků z reflexních testů zůstává otázkou, zda jsou spolehlivými ukazateli zmírnění bolesti při hodnocení látek. Pochybnosti také přináší fakt, že se obranný reflex zachovává i u zvířat spinalizovaných (Kauppila a spol., 1998) anebo u zvířat v anestezii (Harris a Clarke, 2003). Proto zůstává otázkou, zda je obranný reflex bezvýhradně doprovázen zpracováním bolestivého vjemu v mozgovém kortexu.

Ovlivnění výsledků reflexních metod může mít mnohé příčiny. Jednou z nich je aktivace difúzního nocicepčního inhibičního systému, pomocí kterého vzrostou prahy bolesti nejen v místě bolesti, ale i na ostatních místech (Danziger a spol., 2001).

Dalším problémem při měření obranné reakce u modelu CCI může být odlišná motorická schopnost pravé a levé končetiny. Pokles latence reflexu u podvázané končetiny může

zapříčinit nižší zatížení váhou těla, takže může dojít k rychlejší reakci při jejím reflexím oddálení od podnětu (Tétreault a spol., 2011). Analogicky bude kontralaterální končetina reagovat pomaleji, protože na ní spočívá větší váha těla a trvá tedy déle, než se váha přenesse na podvázanou končetinu.

U plantar testu navíc výsledky velmi ovlivňuje teplota kůže na končetinách a teplota prostředí, ve které se provádí měření (Vítková a spol., 2015). U modelu CCI můžeme naměřit rozdílné teploty kůže na podvázané a nepodvázané končetině (Kim a spol., 2012). Takže se nabízí otázka, zda nejsou rozdíly v latenci reflexu jen odrazem teploty končetin. Také je u plantar testu problémem to, že potkani s CCI udržují podvázanou končetinu v kontaktu s podložkou méně než končetinu nepodvázanou (Tétreault a spol., 2011).

2 Vliv CCI na teplotní preferenci

Metoda teplotní preference místa vyžaduje volbu operantní motorické odpovědi a zapojení procesů probíhajících v mozgovém kortexu. Naše výsledky ukazují, že neuropatická bolest způsobená CCI indukovala vytvoření preference pro teplou plotnu a averzi ke studené plotně. Tyto výsledky odpovídají původním zjištěním (Vierck a spol., 2005; Datta a spol., 2010; Salte a spol., 2016).

Vyhýbání se studené plotně je chápáno jako chladová alodynie nebo jako preference teplé plotny. Avšak v předešlých studiích bylo zjištěno, že potkani s CCI nepreferovali teplou plotnu v porovnání s neutrální teplotou (Salte a spol., 2016). Pro chladovou alodynii u CCI svědčí i prodloužené trvání behaviorálních projevů (lízání) po chladové stimulaci nebo také výsledky testu operantního úniku před chladovým stimulem (Vierck a spol., 2005). Z toho důvodu považujeme náš výsledek za projev chladové alodynie. Dokonce bylo navrženo, aby se chladová alodynie považovala za hlavní projev u potkanů s CCI (Baliki a spol., 2005), protože velmi dobře odpovídá klinickým zjištěním, kdy se chladová alodynie běžně vyskytuje u pacientů trpících neuropatickou bolestí (Gierthmühlen a spol., 2012).

Faktory, které ovlivňují výsledky testu teplotní preference místa, mohou být jak vnější, tak vnitřní. Z vnitřních faktorů to jsou především pohlaví, tělesná teplota a stres (Vierck a spol., 2008). Z vnějších faktorů přispívá k modulaci teplotní preference hlavně teplota okolí. Nedávno bylo zjištěno, že i volba podestýlky v chovné kleci může zapříčinit změny v teplotní preferenci (Moehring a spol., 2016).

3 Účinek ghrelinu

Zjistili jsme, že opakované podávání ghrelinu u potkanů s CCI prodloužilo latenci obranného reflexu po nociceptivní tepelné i mechanické stimulaci. Toto zjištění souhlasí s dřívějšími studiemi (Guneli a spol., 2010b; Zhou a spol., 2014; Garcia a spol., 2008). Na rozdíl od nich jsme ale ghrelin podávali až od sedmého dne po operaci. V širším pohledu to znamená, že ghrelin ovlivnil tepelnou hyperalgezii i mechanickou alodynii, i když už byly obě plně rozvinuté. Tyto výsledky naznačují, že by ghrelin mohl mít analgetický nebo antihyperalgezní účinek, a mohl tak být vhodným kandidátem na lék při neuropatické bolesti. Avšak při použití metod vyžadujících zapojení mozkové kůry jsme dostali protikladné výsledky.

Teplotní preference místa (TPP) se ukázala jako vhodná metoda ke stanovení účinku CCI u potkanů (Vierck a spol., 2005; Datta a spol., 2010; Salte a spol., 2016). Testem TPP a reflexními metodami jsme získali rozdílné výsledky o účinku ghrelinu na zvířata s CCI. Zde jsme neprokázali žádnou změnu v teplotní preferenci potkanů s CCI před léčbou a po léčbě ghrelinem, což naznačuje, že ghrelin nemá žádný efekt na chladovou alodynii.

Latence obranného reflexu se vrací k normálním hodnotám po přibližně 40 dnech po operaci CCI, zatímco operantní vyhýbání se studeným stimulům trvá minimálně 14 týdnů, což je v souladu s klinickými projevy neuropatické bolesti u pacientů s periferním poraněním nervu (Vierck a spol., 2005). Výsledky reflexních metod pro hodnocení látek ovlivňujících neuropatickou bolest nemusí být vždy relevantní. Příkladem může být baklofen, pacientům často předepisovaný off-label lék na neuropatické bolesti (Lynch a Watson, 2006; Loder a Biondi, 2004). Ten při použití reflexních metod zvýšil rozdíl mezi latencí obranného reflexu u podvázané a kontralaterální končetiny u CCI zvířat, což naznačovalo, že by neměl mít reálný potenciál v léčbě neuropatické bolesti (Franek a spol., 2004). Avšak v jiné studii z naší laboratoře jsme ukázali, že baklofen při použití TPP testu zahrnující vyšší mozkové funkce vrátil teplotní preference u zvířat s CCI k normálním hodnotám (Salte a spol., 2016). To znamená, že baklofen vykazuje analgetický účinek při použití zvířecího modelu, u kterého tento účinek testy sledující míšní reflex neprokázaly. Takže mimo jiné také proto soudíme, že výsledky z testu TPP lépe odpovídají klinické praxi.

Metoda podmíněné preference místa (CPP) je založena na Pavlovovském podmiňování. Dochází k opakovanému spojování efektu odměny s asociovaným prostředím, kdy se předpokládá, že zvíře začne vyhledávat toto prostředí (Prus a spol., 2009). Test CPP se

používá i při studiu neuropatické bolesti, zejména její spontánní složky, kdy úleva od bolesti zajišťuje odměnu a vytváří tak pozitivní posilování (King a spol., 2009). Zde jsme ukázali, že ghrelin nevyvolá u potkanů s CCI podmíněnou preferenci místa, takže předpokládáme, že ghrelin nemá žádný vliv na spontánní bolest.

Stále ovšem zůstává otázkou, zda samotný ghrelin produkuje preferenci při CPP testu. Některé studie ukazují, že ghrelin vytváří podmíněnou preferenci místa (Jerlhag, 2008; Jerlhag a spol., 2010). Na druhou stranu existují i studie, které tvrdí, že ghrelin nevyvolal preferenci místa při CPP testu (Davis a spol., 2007).

Výhody metody spočívají v tom, že analgetická léčba je odměnou pouze v přítomnosti bolesti (Davoody a spol., 2011), a že výsledky nejsou ovlivněny sedativním účinkem léků (King a spol., 2009). Léky, které ulevují od bolesti u pacientů s neuropatickou bolestí, produkují podmíněnou preferenci místa u potkanů s neuropatií (King a spol., 2009; Davoody a spol., 2011).

Mezi faktory ovlivňující výsledky patří výběr podnětů odlišujících komory, zařízení samotné (dvoukomorové nebo tříkomorové) a látka, u které se účinek odvíjí od dávky. Vysoké dávky některých drog vyvolají averzi, ale dávky nižší produkují preferenci. Musíme také vhodně zvolit znaky pro rozlišení komor. Například klasické použití bílých zdí v jedné komoře a černých zdí v druhé se již nedoporučuje, neboť existuje značná preference pro komoru s černými zdmi (Roma a Riley, 2005), proto se radši doporučuje použít černo-bílé pruhování vertikálně a horizontálně (Davoody a spol., 2011), ale i přesto to někdy není zvykem (Stevenson a spol., 2015). Dále se využívají taktilní podněty a to zejména na podlážce komor, kdy se volí pletivo s různým průměrem ok v každé komoře. Podle míry rozlišitelnosti obou komor se odvíjí i časový interval potřebný pro fázi habituace, lépe odlišitelné komory totiž vyžadují kratší čas habituace.

Také záleží na tom, zda před podmiňováním zjišťujeme základní subjektivní preferenci komor, podle které následně volíme komoru asociovanou s danou látkou. Dřívější studie tuto fázi vynechávaly a nepracovaly s individuální základní preferencí komor. Záleželo tedy na rozhodnutí výzkumníka, kterou komoru bude asociovat s testovanou látkou. To vedlo ovšem ke vzniku nesrovnalostí při působení určitých látek. Calcagnetti a Schechter (Calcagnetti a Schechter, 1994) tento jev také zaregistrovali a rozhodli se udělat experiment ohledně efektu nikotinu. Testováním před podmiňováním zjistili u každého zvířete preferovanou komoru. Došli k závěru, že pokud k podmiňování vyberou méně preferovanou komoru, vznikne po aplikaci nikotinu preference pro tuto komoru. Pokud ovšem zvolí komoru více preferovanou

před testováním, nevytvoří se v závěrečném testování signifikantní preference ani averze, což může být důvodem rozdílných výsledků mezi studiemi.

Nicméně je metoda CPP vhodná pro zjišťování přítomnosti spontánních bolestí a možností jejich potlačení (Davoody a spol., 2011). Také díky ní můžeme získat klinicky validní výsledky, protože léky, které nepotlačují bolest u lidí, nevyvolají CPP ani u zvířat (Navratilova a spol., 2013).

Rozdíly v metodách založených na sledování reflexní odpovědi a metodách sledující operantní motorickou odpověď mohou být způsobeny tím, že ghrelin u modelu CCI vykazuje silnější protizánětlivý a/nebo neuroprotektivní vliv než antinocicepční/analgetický účinek. Bylo zjištěno, že u modelu CCI ghrelin snížil hladiny zánětlivých markerů TNF- α , IL-1 β , IL-6 (Guneli a spol., 2010b). Navíc se prokázalo, že ghrelin inhibuje apoptózu, zlepšuje obnovu funkce axonu a snižuje ztrátu myelinu u modelu poranění míchy (Lee a spol., 2010). Ghrelin zabraňuje také vzniku senzorické i motorické neuropatie a poklesu rychlosti vedení nervu u modelu diabetické neuropatie hlodavců (Tsuchimochi a spol., 2013).

Operantní odpověď je považována za spolehlivější a robustnější ukazatel citlivosti na bolest než reflexní odpověď (Datta a spol., 2010). Vierck a Yezierski ukázali, že k reflexní odpovědi nedojde u mírně studené stimulace (10-15°C), zatímco operantní odpověď zůstává nezměněna. To stejné platí i u tepelné stimulace, která pro reflexní odpověď musí dosáhnout přibližně 51°C a více (Vierck a Yezierski, 2015). Také zvažujeme hypotézu, že protizánětlivý a neuroprotektivní účinek ghreluinu může být zodpovědný za obnovu míšního obranného reflexu a zároveň tak nedochází k odstranění chladové alodynie u TPP testu.

Rozdíly ohledně působení ghreluinu mohou pramenit také z případné závislosti účinku na způsobu aplikace – některé výsledky byly dosaženy po systémové aplikaci, která je nejbližší přirozenému působení ghreluinu, jiné po podání intra-cerebro-ventrikulárním, intra-amygdalárním nebo intra-hipokampálním. Také není stále zodpovězena otázka, zda zvýšená hladina ghreluinu vyvolaná stresem je mediátorem stresové reakce a působí pro-stresově, nebo naopak je součástí protistresové reakce organismu (Chuang a Zigman, 2010). Dosud také nebyla řeč o senzitivaci motoneuronu po CCI a jeho možném ovlivnění ghrelinem.

ZÁVĚR

Chronicky podávaný ghrelin u CCI modelu působil antinocicepčně na práh bolesti při mechanické a tepelné stimulaci. Avšak neovlivnil operantní chladovou alodynii, ani nevyvolal podmíněnou preferenci místa. Předpokládáme tedy, že chronicky podávaný ghrelin může fungovat u plně rozvinuté neuropatické bolesti antinocicepčně, ale nikoliv analgeticky. Tímto byly splněny všechny vytyčené cíle práce.

Novým přínosem této práce je, že jsme zjistili, že ghrelin působí antinocicepčně i u plně rozvinuté neuropatické bolesti. Dále jsme prokázali, že ghrelin nepůsobí u neuropatické bolesti analgeticky. Proto by se další výzkumy v této oblasti měly týkat především antinocicepčního vlivu ghrelu. Domníváme se, že k antinocicepci může docházet prostřednictvím protizánětlivého a/nebo neuroprotektivního vlivu ghrelu.

LITERATURA

AKAMIZU, Takashi, et al. Pharmacokinetics, safety, and endocrine and appetite effects of ghrelin administration in young healthy subjects. *European Journal of Endocrinology*, 2004, 150.4: 447-455.

ALESSANDRI-HABER, Nicole, et al. Transient receptor potential vanilloid 4 is essential in chemotherapy-induced neuropathic pain in the rat. *The Journal of neuroscience*, 2004, 24.18: 4444-4452.

ASAKAWA, Akihiro, et al. A role of ghrelin in neuroendocrine and behavioral responses to stress in mice. *Neuroendocrinology*, 2001, 74.3: 143-147.

AVAU, Bert, et al. Ghrelin is involved in the paracrine communication between neurons and glial cells. *Neurogastroenterology & Motility*, 2013, 25.9: e599-e608.

BALIKI, Marwan, et al. Spared nerve injury rats exhibit thermal hyperalgesia on an automated operant dynamic thermal escape task. *Molecular pain*, 2005, 1.1: 1.

BANKS, William A., et al. Extent and direction of ghrelin transport across the blood-brain barrier is determined by its unique primary structure. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 2002, 302.2: 822-827.

BARTHAS, Florent, et al. The anterior cingulate cortex is a critical hub for pain-induced depression. *Biological psychiatry*, 2015, 77.3: 236-245.

BELL-KROTOSKI, Judith; TOMANCIK, Elizabeth. The repeatability of testing with Semmes-Weinstein monofilaments. *The Journal of hand surgery*, 1987, 12.1: 155-161.

BENNETT, Gary J.; XIE, Y.-K. A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man. *Pain*, 1988, 33.1: 87-107.

BRUNETTI, Luigi, et al. Effects of ghrelin and amylin on dopamine, norepinephrine and serotonin release in the hypothalamus. *European journal of pharmacology*, 2002, 454.2: 189-192.

BURDYGA, Galina, et al. Ghrelin receptors in rat and human nodose ganglia: putative role in regulating CB-1 and MCH receptor abundance. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 2006, 290.6: G1289-G1297.

CAIN, David M.; KHASABOV, Sergey G.; SIMONE, Donald A. Response properties of mechanoreceptors and nociceptors in mouse glabrous skin: an in vivo study. *Journal of neurophysiology*, 2001, 85.4: 1561-1574.

CALCAGNETTI, Daniel J.; SCHECHTER, Martin D. Nicotine place preference using the biased method of conditioning. *Progress in Neuro-psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 1994, 18.5: 925-933.

CARLINI, Valeria P., et al. Differential role of the hippocampus, amygdala, and dorsal raphe nucleus in regulating feeding, memory, and anxiety-like behavioral responses to ghrelin. *Biochemical and biophysical research communications*, 2004, 313.3: 635-641.

CARR, Geoffrey D.; FIBIGER, Hans C.; PHILLIPS, Anthony G. Conditioned place preference as a measure of drug reward. 1989.

COLBURN, Raymond W., et al. Attenuated cold sensitivity in TRPM8 null mice. *Neuron*, 2007, 54.3: 379-386.

COWLEY, Michael A., et al. The distribution and mechanism of action of ghrelin in the CNS demonstrates a novel hypothalamic circuit regulating energy homeostasis. *Neuron*, 2003, 37.4: 649-661.

CUNNINGHAM, Christopher L.; CLEMANS, Jessica M.; FIDLER, Tara L. Injection timing determines whether intragastric ethanol produces conditioned place preference or aversion in mice. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 2002, 72.3: 659-668.

CUNNINGHAM, Christopher L.; GREMEL, Christina M.; GROBLEWSKI, Peter A. Drug-induced conditioned place preference and aversion in mice. *Nature protocols*, 2006, 1.4: 1662-1670.

DANZIGER, Nicolas, et al. Activation of diffuse noxious inhibitory controls (DNIC) in rats with an experimental peripheral mononeuropathy. *Pain*, 2001, 91.3: 287-296.

DATE, Yukari, et al. The role of the gastric afferent vagal nerve in ghrelin-induced feeding and growth hormone secretion in rats. *Gastroenterology*, 2002, 123.4: 1120-1128.

DATTA, Sukdeb, et al. Behavioral and anatomical characterization of the bilateral sciatic nerve chronic constriction (bCCI) injury: correlation of anatomic changes and responses to cold stimuli. *Molecular pain*, 2010, 6.1: 1.

DAVIS, Kristina W.; WELLMAN, Paul J.; CLIFFORD, P. Shane. Augmented cocaine conditioned place preference in rats pretreated with systemic ghrelin. *Regulatory peptides*, 2007, 140.3: 148-152.

DAVOODY, Leyla, et al. Conditioned place preference reveals tonic pain in an animal model of central pain. *The Journal of Pain*, 2011, 12.8: 868-874.

DHAKA, Ajay, et al. Visualizing cold spots: TRPM8-expressing sensory neurons and their projections. *The Journal of Neuroscience*, 2008, 28.3: 566-575.

DIXIT, Vishwa Deep, et al. Ghrelin inhibits leptin-and activation-induced proinflammatory cytokine expression by human monocytes and T cells. *Journal of Clinical Investigation*, 2004, 114.1: 57.

DRAZEN, Deborah L., et al. Effects of a fixed meal pattern on ghrelin secretion: evidence for a learned response independent of nutrient status. *Endocrinology*, 2006, 147.1: 23-30.

ETTENBERG, Aaron, et al. Evidence for opponent-process actions of intravenous cocaine. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 1999, 64.3: 507-512.

FIELDS, H. L., et al. The activity of neurons in the rostral medulla of the rat during withdrawal from noxious heat. *The Journal of Neuroscience*, 1983, 3.12: 2545-2552.

FIELDS, H. L.; MALICK, A.; BURSTEIN, R. Dorsal horn projection targets of ON and OFF cells in the rostral ventromedial medulla. *Journal of Neurophysiology*, 1995, 74.4: 1742-1759.

FRANEK, M.; VACULIN, S.; ROKYTA, R. GABA_B receptor agonist baclofen has non-specific antinociceptive effect in the model of peripheral neuropathy in rat. *PHYSIOLOGICAL RESEARCH*, 2004, 53: 351-355.

GARCIA, José M., et al. Ghrelin prevents cisplatin-induced mechanical hyperalgesia and cachexia. *Endocrinology*, 2008, 149.2: 455-460.

GASKIN, F. Spencer, et al. Ghrelin-induced feeding is dependent on nitric oxide. *Peptides*, 2003, 24.6: 913-918.

GIERTHMÜHLEN, Janne, et al. Sensory signs in complex regional pain syndrome and peripheral nerve injury. *PAIN®*, 2012, 153.4: 765-774.

GRUBER-SCHOFFNEGGER, Doris, et al. Induction of thermal hyperalgesia and synaptic long-term potentiation in the spinal cord lamina I by TNF- α and IL-1 β is mediated by glial cells. *The Journal of Neuroscience*, 2013, 33.15: 6540-6551.

a)GUNELI, Ensari; GUMUSTEKIN, Mukaddes; ATES, Mehmet. Possible involvement of ghrelin on pain threshold in obesity. *Medical hypotheses*, 2010, 74.3: 452-454.

b)GUNELI, Ensari, et al. Effects of repeated administered ghrelin on chronic constriction injury of the sciatic nerve in rats. *Neuroscience letters*, 2010, 479.3: 226-230.

GUNELI, Ensari; KAZIKDAS, Kadir Çağdas; KOLATAN, Efsun. Ghrelin may attenuate proinflammatory cytokine-mediated neuropathic pain. *Medical hypotheses*, 2007, 69.2: 356-360.

GUTIERREZ, Jesus A., et al. Ghrelin octanoylation mediated by an orphan lipid transferase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2008, 105.17: 6320-6325.

HANSSON, Caroline, et al. Central administration of ghrelin alters emotional responses in rats: behavioural, electrophysiological and molecular evidence. *Neuroscience*, 2011, 180: 201-211.

HAQQ, Andrea M., et al. Serum ghrelin levels are inversely correlated with body mass index, age, and insulin concentrations in normal children and are markedly increased in Prader-Willi syndrome. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 2003, 88.1: 174-178.

HARGREAVES, K., et al. A new and sensitive method for measuring thermal nociception in cutaneous hyperalgesia. *Pain*, 1988, 32.1: 77-88.

- HARRIS, John; CLARKE, Rob W. Organisation of sensitisation of hind limb withdrawal reflexes from acute noxious stimuli in the rabbit. *The Journal of physiology*, 2003, 546.1: 251-265.
- HOFTUN, Gry Børmark; ROMUNDSTAD, Pål Richard; RYGG, Marite. Factors associated with adolescent chronic non-specific pain, chronic multisite pain, and chronic pain with high disability: the Young–HUNT Study 2008. *The Journal of Pain*, 2012, 13.9: 874-883.
- HOLMES, E., et al. Circulating ghrelin exists in both lipoprotein bound and free forms. *Annals of clinical biochemistry*, 2009, 46.6: 514-516.
- HOU, Zhongchi, et al. Ghrelin-containing neuron in cerebral cortex and hypothalamus linked with the DVC of brainstem in rat. *Regulatory peptides*, 2006, 134.2: 126-131.
- HOWARD, Richard F., et al. The ontogeny of neuropathic pain: postnatal onset of mechanical allodynia in rat spared nerve injury (SNI) and chronic constriction injury (CCI) models. *Pain*, 2005, 115.3: 382-389.
- HU, Hui-Juan, et al. The kv4. 2 potassium channel subunit is required for pain plasticity. *Neuron*, 2006, 50.1: 89-100.
- HUA, XIAO-YING, et al. The antinociceptive effects of spinally administered neuropeptide Y in the rat: systematic studies on structure-activity relationship. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 1991, 258.1: 243-248.
- CHEN, H. Y., et al. Orexigenic action of peripheral ghrelin is mediated by neuropeptide Y and agouti-related protein. *Endocrinology*, 2004, 145.6: 2607-2612.
- CHUANG, Jen-Chieh; ZIGMAN, Jeffrey M. Ghrelin's roles in stress, mood, and anxiety regulation. *International journal of peptides*, 2010, 2010.
- IASP, IASP. subcommittee on taxonomy. Pain terms. A list with definitions and notes on usage. *Pain*, 1979, 6.3: 249-52.
- JERLHAG, Elisabet, et al. Ghrelin receptor antagonism attenuates cocaine-and amphetamine-induced locomotor stimulation, accumbal dopamine release, and conditioned place preference. *Psychopharmacology*, 2010, 211.4: 415-422.
- JERLHAG, Elisabet. PRECLINICAL STUDY: systemic administration of ghrelin induces conditioned place preference and stimulates accumbal dopamine. *Addiction biology*, 2008, 13.3-4: 358-363.
- JOHANSEN, Joshua P.; FIELDS, Howard L.; MANNING, Barton H. The affective component of pain in rodents: direct evidence for a contribution of the anterior cingulate cortex. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2001, 98.14: 8077-8082.
- JULIUS, David; BASBAUM, Allan I. Molecular mechanisms of nociception. *Nature*, 2001, 413.6852: 203-210.

- KAUPPILA, Timo; KONTINEN, Vesa K.; PERTOVAARA, Antti. Influence of spinalization on spinal withdrawal reflex responses varies depending on the submodality of the test stimulus and the experimental pathophysiological condition in the rat. *Brain research*, 1998, 797.2: 234-242.
- KENSHALO, Dan R., et al. Response properties and organization of nociceptive neurons in area 1 of monkey primary somatosensory cortex. *Journal of neurophysiology*, 2000, 84.2: 719-729.
- KIM, Min Seok, et al. Skin temperature changes following sciatic nerve injury in rats. *Journal of neurotrauma*, 2012, 29.18: 2738-2747.
- KING, Tamara, et al. Unmasking the tonic-aversive state in neuropathic pain. *Nature neuroscience*, 2009, 12.11: 1364-1366.
- KLINE, R. H., et al. Catechol-O-methyltransferase inhibition alters pain and anxiety-related volitional behaviors through activation of β -adrenergic receptors in the rat. *Neuroscience*, 2015, 290: 561-569.
- KOJIMA, Masayasu, et al. Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature*, 1999, 402.6762: 656-660.
- KOJIMA, Masayasu; IDA, Takanori; SATO, Takahiro. Structure of mammalian and nonmammalian ghrelins. *Vitamins & Hormones*, 2007, 77: 31-46.
- KOJIMA, Masayasu; KANGAWA, Kenji. Ghrelin: structure and function. *Physiological reviews*, 2005, 85.2: 495-522.
- LAHUERTA, Juan, et al. Percutaneous cervical cordotomy: a review of 181 operations on 146 patients with a study on the location of "pain fibers" in the C-2 spinal cord segment of 29 cases. *Journal of neurosurgery*, 1994, 80.6: 975-985.
- LAI, Josephine, et al. Inhibition of neuropathic pain by decreased expression of the tetrodotoxin-resistant sodium channel, NaV1. 8. *Pain*, 2002, 95.1: 143-152.
- LEBLANC, Brian W., et al. T-type calcium channel blocker Z944 restores cortical synchrony and thalamocortical connectivity in a rat model of neuropathic pain. *Pain*, 2016, 157.1: 255-263.
- LEE, Jee Y., et al. Inhibition of apoptotic cell death by ghrelin improves functional recovery after spinal cord injury. *Endocrinology*, 2010, 151.8: 3815-3826.
- LEFFLER, A.; MÖNTER, B.; KOLTZENBURG, M. The role of the capsaicin receptor TRPV1 and acid-sensing ion channels (ASICs) in proton sensitivity of subpopulations of primary nociceptive neurons in rats and mice. *Neuroscience*, 2006, 139.2: 699-709.
- LEI, Liu-Gen, et al. NMDA receptors in the anterior cingulate cortex mediate pain-related aversion. *Experimental neurology*, 2004, 189.2: 413-421.

- LEITE-MOREIRA, Adelino F.; SOARES, Joao-Bruno. Physiological, pathological and potential therapeutic roles of ghrelin. *Drug discovery today*, 2007, 12.7: 276-288.
- LEUNG, Po-Ki, et al. The truncated ghrelin receptor polypeptide (GHS-R1b) acts as a dominant-negative mutant of the ghrelin receptor. *Cellular signalling*, 2007, 19.5: 1011-1022.
- LI, Wei Gen, et al. Ghrelin inhibits proinflammatory responses and nuclear factor- κ B activation in human endothelial cells. *Circulation*, 2004, 109.18: 2221-2226.
- LIN, Yingzi, et al. Ghrelin acts at the nucleus of the solitary tract to decrease arterial pressure in rats. *Hypertension*, 2004, 43.5: 977-982.
- LODER, Elizabeth W.; BIONDI, David M. Off-Label Prescribing of Drugs in Specialty Headache Practice. *Headache: The Journal of Head and Face Pain*, 2004, 44.7: 636-641.
- LOESER, John D.; TREEDE, Rolf-Detlef. The Kyoto protocol of IASP basic pain terminology. *Pain*, 2008, 137.3: 473-477.
- LUTTER, Michael, et al. The orexigenic hormone ghrelin defends against depressive symptoms of chronic stress. *Nature neuroscience*, 2008, 11.7: 752-753.
- LYNCH, Mary E.; WATSON, C. Peter N. The pharmacotherapy of chronic pain: A review. *Pain Research & Management: The Journal of the Canadian Pain Society*, 2006, 11.1: 11.
- MAUDERLI, Andre P.; ACOSTA-RUA, Antonio; VIERCK, Charles J. An operant assay of thermal pain in conscious, unrestrained rats. *Journal of neuroscience methods*, 2000, 97.1: 19-29.
- MCKEMY, David D.; NEUHAUSSER, Werner M.; JULIUS, David. Identification of a cold receptor reveals a general role for TRP channels in thermosensation. *Nature*, 2002, 416.6876: 52-58.
- MELZACK, Ronald. Gate control theory: On the evolution of pain concepts. In: *Pain forum*. Churchill Livingstone, 1996. p. 128-138.
- MERSKEY, Harold; BOGDUK, Nikolai. Classification of chronic pain, IASP Task Force on Taxonomy. *Seattle, WA: International Association for the Study of Pain Press*, 1994.
- MIAO, Yanying, et al. Ghrelin protects cortical neuron against focal ischemia/reperfusion in rats. *Biochemical and biophysical research communications*, 2007, 359.3: 795-800.
- MOEHRING, Francie; O'HARA, Crystal L.; STUCKY, Cheryl L. Bedding Material Affects Mechanical Thresholds, Heat Thresholds, and Texture Preference. *The Journal of Pain*, 2016, 17.1: 50-64.
- MOON, Minho, et al. Neuroprotective effect of ghrelin in the 1-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine mouse model of Parkinson's disease by blocking microglial activation. *Neurotoxicity research*, 2009, 15.4: 332-347.

- MUCCIOLI, G., et al. Binding of 125I-labeled ghrelin to membranes from human hypothalamus and pituitary gland. *Journal of endocrinological investigation*, 2001, 24.3: RC7-RC9.
- NAKASHIMA, Satoshi F., et al. Receiving of emotional signal of pain from conspecifics in laboratory rats. *Royal Society Open Science*, 2015, 2.4: 140381.
- NAVRATILOVA, Edita, et al. Evaluation of reward from pain relief. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 2013, 1282.1: 1-11.
- NAVRATILOVA, Edita, et al. Pain relief produces negative reinforcement through activation of mesolimbic reward–valuation circuitry. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2012, 109.50: 20709-20713.
- NAZNIN, Farhana, et al. Diet-induced obesity causes peripheral and central ghrelin resistance by promoting inflammation. *Journal of Endocrinology*, 2015, 226.1: 81-92.
- OBARA, Ilona, et al. Nerve injury-induced changes in Homer/glutamate receptor signaling contribute to the development and maintenance of neuropathic pain. *PAIN®*, 2013, 154.10: 1932-1945.
- OKUN, Alec, et al. Transient inflammation-induced ongoing pain is driven by TRPV1 sensitive afferents. *Molecular pain*, 2011, 7.1: 4.
- PALERMO, Tonya M.; KISKA, Raechel. Subjective sleep disturbances in adolescents with chronic pain: relationship to daily functioning and quality of life. *The Journal of Pain*, 2005, 6.3: 201-207.
- PARK, Hue Jung, et al. Persistent Hyperalgesia in the Cisplatin-Treated Mouse as Defined by Threshold Measures, the Conditioned Place Preference Paradigm and Changes in Dorsal Root Ganglia Activated Transcription Factor 3: The Effects of Gabapentin, Ketorolac and Etanercept. *Anesthesia and analgesia*, 2013, 116.1: 224.
- PATKINA, Nadezhda A.; ZVARTAU, Edwin E. Caffeine place conditioning in rats: comparison with cocaine and ethanol. *European neuropsychopharmacology*, 1998, 8.4: 287-291.
- PEARCE, John M.; HALL, Geoffrey. A model for Pavlovian learning: variations in the effectiveness of conditioned but not of unconditioned stimuli. *Psychological review*, 1980, 87.6: 532.
- PRUS, Adam J.; JAMES, John R.; ROSECRANS, John A. Conditioned place preference. 2009.
- QIU, Yunhai, et al. Conduction velocity of the spinothalamic tract in humans as assessed by CO₂ laser stimulation of C-fibers. *Neuroscience letters*, 2001, 311.3: 181-184.
- QU, Chaoling, et al. Lesion of the rostral anterior cingulate cortex eliminates the aversiveness of spontaneous neuropathic pain following partial or complete axotomy. *PAIN®*, 2011, 152.7: 1641-1648.

- RAINVILLE, Pierre, et al. Hypnosis modulates activity in brain structures involved in the regulation of consciousness. *Cognitive Neuroscience, Journal of*, 2002, 14.6: 887-901.
- REIMER, Martina Kvist; PACINI, Giovanni; AHRÉN, B. O. Dose-dependent inhibition by ghrelin of insulin secretion in the mouse. *Endocrinology*, 2003, 144.3: 916-921.
- RICHARD, Sabine, et al. Activation of the parabrachio-amygdaloid pathway by immune challenge or spinal nociceptive input: A quantitative study in the rat using Fos immunohistochemistry and retrograde tract tracing. *Journal of Comparative Neurology*, 2005, 481.2: 210-219.
- RODGERS, R. J., et al. Orexins and appetite regulation. *Neuropeptides*, 2002, 36.5: 303-325.
- ROMA, Peter G.; RILEY, Anthony L. Apparatus bias and the use of light and texture in place conditioning. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 2005, 82.1: 163-169.
- ROSSI, P., et al. A simple method for estimating conduction velocity of the spinothalamic tract in healthy humans. *Clinical neurophysiology*, 2000, 111.11: 1907-1915.
- ROYCHOWDHURY, S. M.; FIELDS, H. L. Endogenous opioids acting at a medullary μ -opioid receptor contribute to the behavioral antinociception produced by GABA antagonism in the midbrain periaqueductal gray. *Neuroscience*, 1996, 74.3: 863-872.
- SALTE, Kim, et al. TITLE: Baclofen reversed thermal place preference in rats with chronic constriction injury. *Physiol Res*, 2016 in press.
- SATO, Takahiro, et al. Structure, regulation and function of ghrelin. *Journal of biochemistry*, 2012, 151.2: 119-128.
- SEAL, Rebecca P., et al. Injury-induced mechanical hypersensitivity requires C-low threshold mechanoreceptors. *Nature*, 2009, 462.7273: 651-655.
- SCHOUENBORG, J.; KALLIOMÄKI, J. Functional organization of the nociceptive withdrawal reflexes. *Experimental brain research*, 1990, 83.1: 67-78.
- SIBILIA, Valeria, et al. Ghrelin inhibits inflammatory pain in rats: involvement of the opioid system. *Neuropharmacology*, 2006, 51.3: 497-505.
- SIBILIA, Valeria, et al. Pharmacological characterization of the ghrelin receptor mediating its inhibitory action on inflammatory pain in rats. *Amino acids*, 2012, 43.4: 1751-1759.
- SIKANDAR, Shafaq; AASVANG, Eske Kvanner; DICKENSON, Anthony H. Scratching the surface: the processing of pain from deep tissues. *Pain Management*, 2016, 0.
- SIMONE, Donald A.; KAJANDER, Keith C. Responses of cutaneous A-fiber nociceptors to noxious cold. *Journal of neurophysiology*, 1997, 77.4: 2049-2060.
- SKIBICKA, Karolina P., et al. Ghrelin interacts with neuropeptide Y Y1 and opioid receptors to increase food reward. *Endocrinology*, 2011, 153.3: 1194-1205.

- SKIBICKA, Karolina P.; DICKSON, Suzanne L. Ghrelin and food reward: the story of potential underlying substrates. *Peptides*, 2011, 32.11: 2265-2273.
- SPIKE, R. C., et al. A quantitative and morphological study of projection neurons in lamina I of the rat lumbar spinal cord. *European Journal of Neuroscience*, 2003, 18.9: 2433-2448.
- SPINA, Liliana, et al. Withania somnifera Dunal (Indian ginseng) impairs acquisition and expression of ethanol-elicited conditioned place preference and conditioned place aversion. *Journal of Psychopharmacology*, 2015, 29.11: 1191-1199.
- SPRENGER, Till, et al. Opioidergic activation in the medial pain system after heat pain. *Pain*, 2006, 122.1: 63-67.
- STASIAK, Karen L., et al. Species-specific assessment of pain in laboratory animals. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science*, 2003, 42.4: 13-20.
- STEVENSON, Glenn W., et al. The mixed-action delta/mu opioid agonist MMP-2200 does not produce conditioned place preference but does maintain drug self-administration in rats, and induces in vitro markers of tolerance and dependence. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 2015, 132: 49-55.
- STOETER, P., et al. Cerebral activation in patients with somatoform pain disorder exposed to pain and stress: an fMRI study. *Neuroimage*, 2007, 36.2: 418-430.
- TÉTREAU, Pascal, et al. Weight bearing evaluation in inflammatory, neuropathic and cancer chronic pain in freely moving rats. *Physiology & behavior*, 2011, 104.3: 495-502.
- TIAN, Liujun, et al. Role of PAR2 in regulating oxaliplatin-induced neuropathic pain via TRPA1. *Translational Neuroscience*, 2015, 6.1.
- TORSNEY, Carole; MACDERMOTT, Amy B. Disinhibition opens the gate to pathological pain signaling in superficial neurokinin 1 receptor-expressing neurons in rat spinal cord. *The Journal of neuroscience*, 2006, 26.6: 1833-1843.
- TSUCHIMOTO, Wakaba, et al. Ghrelin prevents the development of experimental diabetic neuropathy in rodents. *European journal of pharmacology*, 2013, 702.1: 187-193.
- UEBERBERG, B., et al. Expression of ghrelin and its receptor in human tissues. *Hormone and metabolic research= Hormon-und Stoffwechselforschung= Hormones et métabolisme*, 2009, 41.11: 814-821.
- VAN HECKE, O.; TORRANCE, N.; SMITH, B. H. Chronic pain epidemiology and its clinical relevance. *British journal of anaesthesia*, 2013, 111.1: 13-18.
- VERGNANO, Angela M., et al. The gastrointestinal hormone ghrelin modulates inhibitory neurotransmission in deep laminae of mouse spinal cord dorsal horn. *Endocrinology*, 2008, 149.5: 2306-2312.

- VERRI, Waldiceu A., et al. Hypernociceptive role of cytokines and chemokines: targets for analgesic drug development?. *Pharmacology & therapeutics*, 2006, 112.1: 116-138.
- VIERCK, Charles J., et al. Sex differences in thermal pain sensitivity and sympathetic reactivity for two strains of rat. *The journal of Pain*, 2008, 9.8: 739-749.
- VIERCK, Charles J., et al. Low dose systemic morphine attenuates operant escape but facilitates innate reflex responses to thermal stimulation. *The Journal of Pain*, 2002, 3.4: 309-319.
- VIERCK, Charles J.; ACOSTA-RUA, Antonio J.; JOHNSON, Richard D. Bilateral chronic constriction of the sciatic nerve: a model of long-term cold hyperalgesia. *The Journal of Pain*, 2005, 6.8: 507-517.
- VIERCK, Charles J.; YEZIERSKI, Robert P. Comparison of operant escape and reflex tests of nociceptive sensitivity. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 2015, 51: 223-242.
- VILLEMURE, Chantal; BUSHNELL, M. Catherine. Mood influences supraspinal pain processing separately from attention. *The Journal of Neuroscience*, 2009, 29.3: 705-715.
- VILLEMURE, Chantal; LAFERRIÈRE, Audrey C.; BUSHNELL, M. Catherine. The ventral striatum is implicated in the analgesic effect of mood changes. *Pain Research & Management: The Journal of the Canadian Pain Society*, 2012, 17.2: 69.
- VÍTKOVÁ, J., et al. The effect of acclimatization and ambient temperature on heat withdrawal threshold in rats. *European Journal of Pain*, 2015, 19.1: 21-27.
- WALCZAK, Jean-Sébastien; BEAULIEU, Pierre. Comparison of three models of neuropathic pain in mice using a new method to assess cold allodynia: the double plate technique. *Neuroscience letters*, 2006, 399.3: 240-244.
- WEI, Jie, et al. In vivo characterization of the effects of ghrelin on the modulation of acute pain at the supraspinal level in mice. *Peptides*, 2013, 43: 76-82.
- WINKLER, Clayton W., et al. Kappa opioid receptor (KOR) and GAD67 immunoreactivity are found in OFF and NEUTRAL cells in the rostral ventromedial medulla. *Journal of neurophysiology*, 2006, 96.6: 3465-3473.
- XU, Jingjing, et al. Ghrelin protects against cell death of hippocampal neurons in pilocarpine-induced seizures in rats. *Neuroscience letters*, 2009, 453.1: 58-61.
- XU, Mei, et al. NMDA receptor-mediated activation of medullary pro-nociceptive neurons is required for secondary thermal hyperalgesia. *Pain*, 2007, 127.3: 253-262.
- YAMAZAKI, Mami, et al. Ghrelin increases intracellular Ca²⁺ concentration in the various hormone-producing cell types of the rat pituitary gland. *Neuroscience letters*, 2012, 526.1: 29-32.

YASAKA, Toshiharu, et al. Populations of inhibitory and excitatory interneurons in lamina II of the adult rat spinal dorsal horn revealed by a combined electrophysiological and anatomical approach. *Pain*, 2010, 151.2: 475-488.

YEZIERSKI, Robert P.; BROTON, James G. Functional properties of spinomesencephalic tract (SMT) cells in the upper cervical spinal cord of the cat. *Pain*, 1991, 45.2: 187-196.

YILDIZ, Bulent O., et al. Alterations in the dynamics of circulating ghrelin, adiponectin, and leptin in human obesity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2004, 101.28: 10434-10439.

YU, Yongmei, et al. Effects of peptides, with emphasis on feeding, pain, and behavior: A 5-year (1999–2003) review of publications in Peptides. *Peptides*, 2004, 25.12: 2257-2289.

ZHAO, Z., et al. Ghrelin administration enhances neurogenesis but impairs spatial learning and memory in adult mice. *Neuroscience*, 2014, 257: 175-185.

ZHOU, Cheng-Hua, et al. Ghrelin Alleviates Neuropathic Pain Through GHSR-1a–Mediated Suppression of the p38 MAPK/NF- κ B Pathway in a Rat Chronic Constriction Injury Model. *Regional anesthesia and pain medicine*, 2014, 39.2: 137-148.

ZIGMAN, Jeffrey M., et al. Expression of ghrelin receptor mRNA in the rat and the mouse brain. *Journal of Comparative Neurology*, 2006, 494.3: 528-548.

ZIMMERMANN, Manfred. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *Pain*, 1983, 16.2: 109-110.